

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

PLATELETTEN FAKİR TAVŞAN PLAZMASI İLE
SULANDIRILMIŞ BOTULİNÜM A TOKSİNİNİN
BİYOYARARLANIM ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Dr. SERHAT ŞİBAR

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. KEMAL FINDIKÇIOĞLU

ANKARA
ŞUBAT 2016

ÖNSÖZ

Çalışmanın her aşamasında bilimsel ve teknik olarak bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, çalışma boyunca bir ağabey yakınlığı ile yol gösteren ve plastik cerrahi eğitimimizde birçok zorlu vakada bize olan güvenini esirgemeyen ve o güveni her zaman bizlere hissettiren tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Kemal FINDIKÇIOĞLU'na;

Tez çalışmalarım sırasında değerli fikirsel desteklerini esirgemeyen, tez çalışmalarımın fikir babası olan, bizlere plastik cerrahide farklı perspektifler kazandıran ve kafamızın içinde her zaman yeni kıvılcımların çıkmasını sağlayan, aynı zamanda Cleft Craft'ı bizlere sevdiren ve okumayı öğreten değerli Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Seyhan ÇENETOĞLU'na;

Uzmanlık eğitimimiz boyunca bizleri her zaman yorulmadan dinleyen, bir aile olmayı öğreten, davranışları ile bizlere her zaman örnek olan, yol gösteren değerli hocalarımız Sayın Prof. Dr. Cemalettin ÇELEBİ'ye, Sayın Prof. Dr. Osman LATİFOĞLU'na, Sayın Prof. Dr. Sühan AYHAN'a, Sayın Prof. Dr. Selahattin ÖZMEN'e ve Sayın Doç. Dr. Serhan TUNCER'e;

Çalışmanın elektronöromyografik incelemelerini büyük özveri ile yapan ve yorumlayan ve bizden güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Murat ZİNNUROĞLU'na;

Çalışmanın deneysel aşamalarının yürütüldüğü Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi veteriner hekimlerine ve personeline;

Çalışmanın istatistiksel analizlerini yapan Sayın Salih ERGÖÇEN'e ve Gazi Üniversitesi Biyoistatistik A.D'ndan Dr. Erkan BÜYÜKDEMİRCİ'ye;

Tezimin her aşamasında yardımcı olan Dr. Burak PASİNLİOĞLU'na , Dr. Ayhan Işık ERDAL'a, ve Dr. Giray GENÇ'e ve yıllardır beraber çalıştığımız diğer tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma;

Beni yetiştiren ve bugünlere getiren anneme, babama ve yakında meslektaşım olacak olan değerli kardeşim Dr. Kemal ŞİBAR'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Serhat ŞİBAR

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 TROMBOSİT VE TROMBOSİTTEN FAKİR PLAZMA.....	3
2.2 BOTULİNUM A TOKSİNİ (BTX-A).....	12
2.3 TAVŞANLARDA BOTULİNUM TOKSİN DENEYLERİ	25
2.4 TAVŞAN AURİCULAR KAS ANATOMİSİ VE DENEY MODELİ	26
2.5 ALBUMİN MOLEKÜLER YAPISI VE ÖZELLİKLERİ	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1 DENEY HAZIRLIKLARI	32
3.2 ÇALIŞMA GRUPLARI	33
3.3 BOTULİNUM TOKSİN TİP-A' NIN HAZIRLANMASI.....	34
3.4 TAVŞAN ALBUMİNİN HAZIRLANMASI	35
3.5 TROMBOSİTTEN FAKİR PLAZMANIN HAZIRLANMASI	36
3.6 DENEY İÇİN GEREKLİ ARAÇ GEREÇLER	39
3.7 DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ	39
3.7.1 GÖRSEL DEĞERLENDİRME VE FOTOĞRAFİK KAYIT	39
3.7.2 ELEKTRONÖROMYOGRAFİ (ENMG)	41
3.8 VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1 GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI	44
4.2 GÖRSEL DEĞERLENDİRME BULGULARI	44
4.3 ELEKTRONÖROMYOGRAFİK DEĞERLENDİRME BULGULARI	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
6. ÖZET	70
7. SUMMARY.....	72
8. KAYNAKLAR	74
9. ÖZGEÇMİŞ	86

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otolog kanın santrifüj işlemlerinden geçirilmesi ile elde edilen ' Trombositten Fakir Plazma ' (TFP) fibrin yapıştırıcı olarak da bilinmektedir. Trombositten Zengin Plazmanın (TZP) kabaca trombositten fakir formu şeklinde de tanımlanabilir.¹⁻² TFP içinde az oranda trombosit ve daha çok oranda fibrinojen içermektedir, bu ürün otolog kandan elde edilebileceği gibi ticari hazır ürünler şeklinde de piyasada bulunmaktadır. Ticari formları TFP'nin içinde yer alan fibrinojenin trombin ve kalsiyum ile muamele edilmesi sonucu oluşan polimerize formlar şeklinde bulunmaktadır .

TFP ilk olarak 20. yüzyılın başlarında tanımlanmış olup adheziv özelliği olması, operasyon süresini kısaltması ve hızlı etki süresinden dolayı günümüze kadar birçok araştırmanın konusu haline gelmiştir. Günümüzde plastik cerrahi, ortopedi, beyin cerrahi, gastrointestinal sistem cerrahileri ve endoskopik cerrahiler gibi birçok alanda hemostatik ajan olarak kullanılmaktadır.³⁻⁴ Otolog kanın santrifüj işleminden geçirilmesi ile TZP ve TFP aynı anda elde edilebilmektedir. TFP ticari form olan fibrin yapıştırıcılar ile benzer özelliklerde olup aralarındaki fark TFP' nin daha düşük konsantrasyonlarda fibrinojen içermesidir.⁵⁻⁹ Bu farka rağmen TFP' nin adheziv özellikleri bulunmaktadır. TFP, fibrinojen dışında kan proteinlerinden özellikle albumin başta olmak üzere gama globulin ve immun serum globulinlerini de içermektedir.

Botulinum A Toksini (BTxA) gram (+) sporlu anaerobik bir basil olan Clostridium Botulinum'dan elde edilen, kas-sinir kavşağına presinaptik sinir

terminalinden asetilkolin salımını inhibe ederek paralitik etki gösteren kuvvetli bir nörotoksindir. Toksin Plastik cerrahi, Dermatoloji, Ortopedi, Fizik Tedavi ve Nöroloji gibi bölümlerce yaygın olarak kullanılmaktadır. Plastik Cerrahi alanında esas kullanım alanı fasiyal çizgilerin kozmetik amaçlı kemodenervasyonu olup, bunların yanında hiperhidrozis, temporomandibuler eklem hastalıkları, migren tipi baş ağrısı, blefarospazm ve flep cerrahilerinde de kullanılmaktadır.

BTxA 150 kDa ağırlığında hafif ve ağır zincirden oluşan polipeptit yapılı bir moleküldür ve hafif zincir çinko bağımlı metalloproteinaz enzim aktivitesini içermektedir.¹⁰ Toksin motor son plakta sinire endositoz yoluyla alınmakta ve hafif zincir kolinerjik sinir terminalinde asetilkolinin kalsiyum (Ca^{++}) bağımlı egzozitozunda görev alan SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive fusion protein Attachment REceptor) membran kompleksine bağlanarak yapısını bozmakta ve kolinerjik transmisyonu engellemesi sonucunda motor son plakta aksiyon potansiyeli oluşamamaktadır.¹¹

BTxA toksininin etkisini geri döndürmek için potasyum (K^+) kanal blokerleri, endositoz antagonistleri ve hafif zincirdeki metalloproteinaz aktivitesini bozan çeşitli ajanlar tanımlanmıştır ancak biyoyararlanımı arttırmaya yönelik literatürde kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur.¹²

Yapılan literatür taramalarında BTxA' nın biyoyararlanımını arttırmaya yönelik nöroloji kaynaklarında in-vitro olarak yapılmış sınırlı sayıda deneysel çalışma mevcuttur.¹³⁻¹⁴ Bu deneysel çalışmaların hepsinde biyoyararlanımı

arttırmak için hazır insan albumini kullanılmıştır. Deneysel hayvan modelinde hayvanın kendisinden yeterli miktarda saf albumin izolasyonunun hem mümkün olmaması hem de maliyetinin çok yüksek olması nedeniyle hayvanların otolog saflaştırılmış albumini ile toksin sulandırılmasının hem deneysel olarak ve hem de klinik pratikte insan modellerine uyarlanması pek mümkün değildir. Bu deneysel çalışma modelinde otolog albumin yerine hem deneysel modellerde kolay elde edilebilirliği, hem de pratik ve ucuz maliyetli olması nedeniyle deneklerin otolog TFP' sinin kullanılması planlandı. Bunun nedeni TFP' nin içeriğinde hem albumin bulunması hem de kliniğimizde daha önceden yapılmış bir çalışmada TZP mezoterapi ile BTxA kombinasyonunun BTxA' nın paralitik etkisini azalttığı saptanmış olmasıdır.¹⁵ Ayrıca insanlarda hazır insan albumini ile sulandırılmış toksin modelini temsil etmesi için deney hayvanının kendi türüne ait olan hazır albumin preparatlarının kullanılması planlanmıştır.

Çalışmamızın çıkış noktası yukarıdaki durumlar baz alınarak planlanmış ve TFP ve/veya albumin ile sulandırmanın BTxA üzerinde biyoyararlanıma bir katkısının olup olmadığı ve klinik uygulanabilirliği açısından araştırma yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

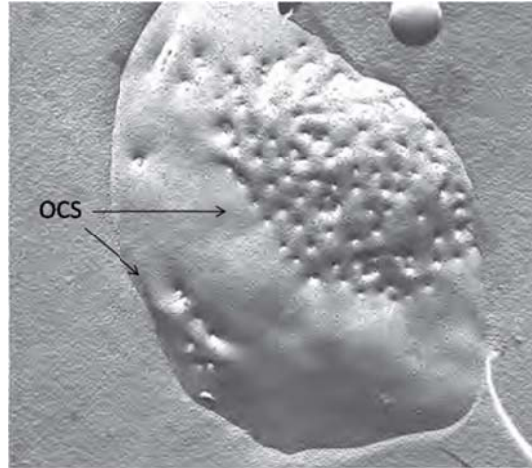
2.1 TROMBOSİT VE TROMBOSİTTEN FAKİR PLAZMA

Trombositler kemik iliğinde megakaryositler tarafından üretilen kandaki en küçük şekilli elemanlardır. 2-5 µm çaplı disk şeklindeki hücresel fragmanlardır. İnsanlarda nükleus içermezler mitokondri, mRNA ve sitoplazma içeriğinden

oluşurlar. Sayıları ortalama 150-300.000 arasında değişmekle birlikte dolaşımdaki ömürleri 8-10 gündür. Periferik yaymada trombositler kümeler halinde görülmektedir. Dolaşımda yer alan en küçük hücre olmaları, kan akımında bu hücrelerin en periferde seyretmesine ve vasküler endotel ile yakın temasta olmalarına yol açar. Esas fonksiyonları vasküler endotelyal hasar meydana geldiğinde aktifleşerek kümelenip trombotik tıkaç (pıhtı) oluşturarak hemostazı sağlamaktır.

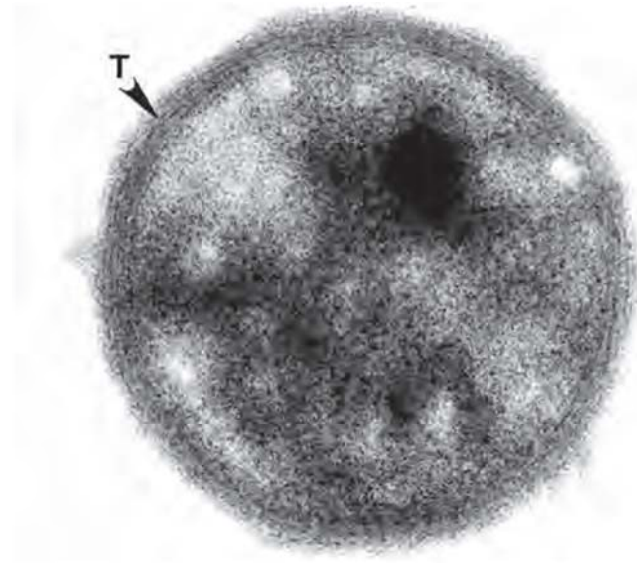
Trombositler yapısal olarak periferden santrale doğru 4 farklı zona ayrılabilir.¹⁶⁻¹⁷

1) Periferal zon: Glikoproteinden zengin bölge (Trombosit adhezyon, aktivasyon ve aggregasyon). Bu bölgede hücre membranına açılan ufak delikler olup bu delikler açık kanaliküler sistem ile bağlantılıdır (**Şekil 1**).



Şekil 1: Trombosit yapısı.¹⁶ Açık kanaliküler sistem ve hücre membranı arasındaki bağlantı. Trombositin sol dış kenarında ve sağ tarafında daha yoğun olan porlar. (x 26.000) OCS (Open canalicular system)

2) Sol-gel zon: Trombositin diskoid şeklinin korunmasına yardımcı olan mikrotübül ve mikrofilamentlerden zengin alan (**Şekil 2**).



Şekil 2: Trombosit yüzey membranı uzaklaştırıldıktan sonra mikrotübül (T) sarmalın görünümü¹⁶. Siyah alanlar granül yapı içermekte ve elektron dense olarak görülmekte. Beyaz alanlar sitoplazmada bulunan negatif boyanmış mikrofilamentler (x 22.000).

3. Organel zon: Trombosit granülleri açısından zengin alandır. Bu alanda α granül, yoğun cisim (δ granül) ve lizozomlar olmak üzere 3 majör sekretuar granül bulunmaktadır (**Tablo 1**).¹⁸⁻¹⁹

Tablo 1: Trombositte bulunan granüller ve içerikleri

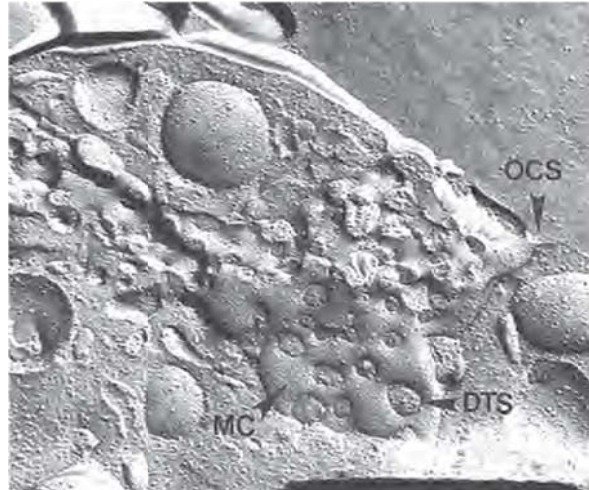
Alfa Granül	Delta Granül (Yoğun cisim)	Lizozomlar
1) Koagülan ve Antikoagülan Faktörler Faktör V, IX, XIII, protein S, plazminojen	1) Katyonlar Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+}	1) Asit Proteazlar Katepsin, elastaz, kollojenaz, karboksipeptidaz
2) Adezyon molekülleri Fibrinojen, von Willebrand faktör	2) Fosfatlar Polifosfat, pirofosfat	2) Glikohidrolazlar Glikozidaz, galaktozidaz, glukuronozidaz
3) Büyüme faktörleri EGF, IGF, TGF- β	3) Biyoaktif aminler Serotonin, histamin	3) Anti Fosfatazlar Asit fosfataz
4) Anjiyogenik faktörler VEGF, FGF, PDGF	4) Nükleotidler ATP, ADP, UTP, GTP	
5) Proteaz inhibitörleri α_2 makroglobulin α_2 antiplazmin Metalloproteinaz inhibitörleri		
6) Albumin ve immun mediatörler (C3, C4, Ig G)		

Alfa granüller trombositlerde bulunan ana granül olup yapısında 300'den fazla çözünebilir protein bulunmaktadır. Bu granüller koagülasyon, adhezyon, inflamasyon, hücre büyümesi ve konak defansında rol oynayan mediatörleri içermektedir.

Yoğun (Dense) granüller biyoaktif aminler ve bunun yanında bazı ilaçlara direnç gelişiminden sorumlu olan taşıyıcı proteinleri yapısında barındırmaktadır.

Lizozomal granüller ise yapısında protein, karbonhidrat ve lipit metabolizmasından sorumlu olan enzimatik yapıları içermektedir.

4) Membranöz zon: Yoğun tübüler sistemi içerir (**Şekil 3**). Bu sistem tromboksan A2 sentezinden sorumlu olup trombosit membranı ile dış ortama bağlanarak tromboksan A2 salımını sağlar.



Şekil 3: Gözeli membran kompleksi (MC), açık kanaliküler sistem (OCS) ve yoğun tübüler sistem (DTS)'den oluşmaktadır (x50.000).¹⁶

TROMBOSİTTEN FAKİR PLAZMA

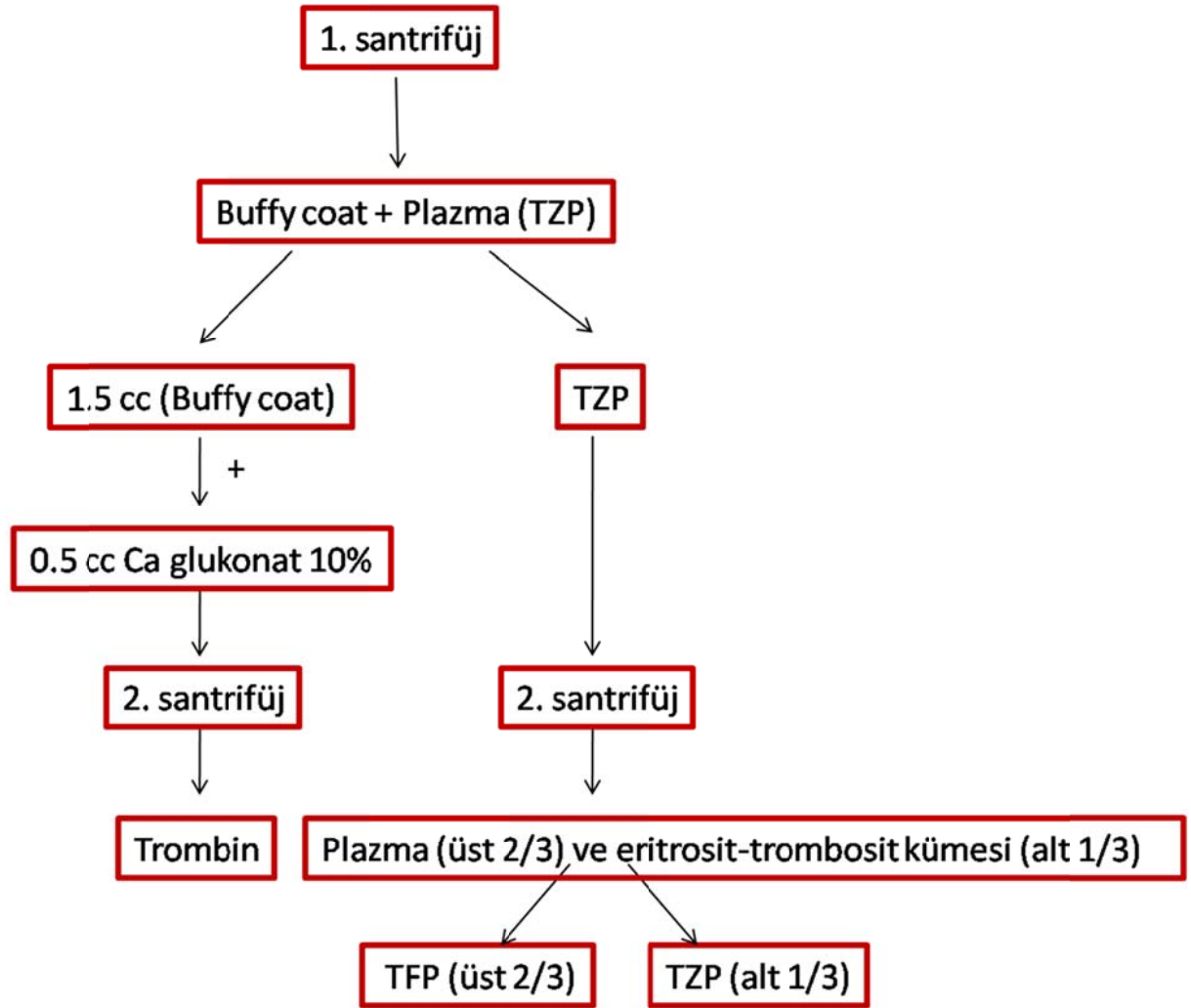
Fibrin yapıştırıcı veya TZIP' nin trombositten fakir formu olarakta bilinen TFP tam kanın santrifüjü sonrasında elde edilen iki plazma fraksiyonundan en üstte yer alan düşük moleküler ağırlıklı az oranda trombosit ve daha çok oranda fibrinojen içeren plazma kısmı olarak tanımlanmaktadır.¹⁻²

Birçok cerrahi branş tarafından esas olarak hemostatik ajan sıfatıyla kullanılmış olup, bu amaçla kullanımı ilk olarak 1909 yılında Bergel tarafından tanımlanmıştır. Young ve Medawar 1940 yılında periferik sinir onarımlarında ve Cronkite 1944'te sığır trombinini ile muamele edilmiş plazmayı cilt grefti uygulamalarında kullanmıştır.²⁰⁻²⁴ Literatürde plazmanın alt ünitelere ayrıştırılmasına ve TFP elde etme protokollerine birçok kaynakta rastlanmaktadır(Şekil 4).²⁴⁻³⁵

Günümüzde TFP (fibrin yapıştırıcı) 2 farklı yöntemle elde edilerek kullanılabilir. Bunlardan biri, otolog alınan periferik venöz kanın 2 kere santrifüj işleminden geçirilerek elde edilmesiyle olmaktadır. Diğer yöntem ise hazır ticari preparatların in-vitro ortamda hazırlanması ile olmaktadır. Otolog olarak elde edilen TFP, ticari hazır preparatlarla karşılaştırıldığında maliyeti daha düşük olup, daha az yoğunlukta fibrinojen içeriğine sahiptir buna rağmen yapılmış olan literatürdeki yayınlarda TFP' nin hemostatik amaçlı başarı ile kullanıldığı görülmektedir.^{1,28,36-45} Ayrıca ticari preparatlarda düşükte olsa hastalık geçiş riski bulunmaktadır. Bu ticari preparatlar ilk olarak 1972 yılında Matras ve arkadaşları tarafından Avrupa'da kullanıma sunulmuş olup, Amerika'da 1998 yılında FDA

onayı aldıktan sonra kullanıma girmiştir.²² Tisseel (Artiss-Baxter, Westlake Village, CA, USA), Evicel (Johnson & Johnson, Somerville, NJ,USA), Cryoseal (Thermogenesis, Rancho Cordova, CA,USA), Vitagel (Orthavita, Malvern, PA, USA) günümüzde FDA onayı almış hazır preparatlardan bazılarıdır. Bu preparatların ve TFP' nin literatürde tanımlanmış olan çeşitli endikasyon ve endikasyon dışı kullanım alanları bulunmaktadır(**Şekil 5 ve 6**).

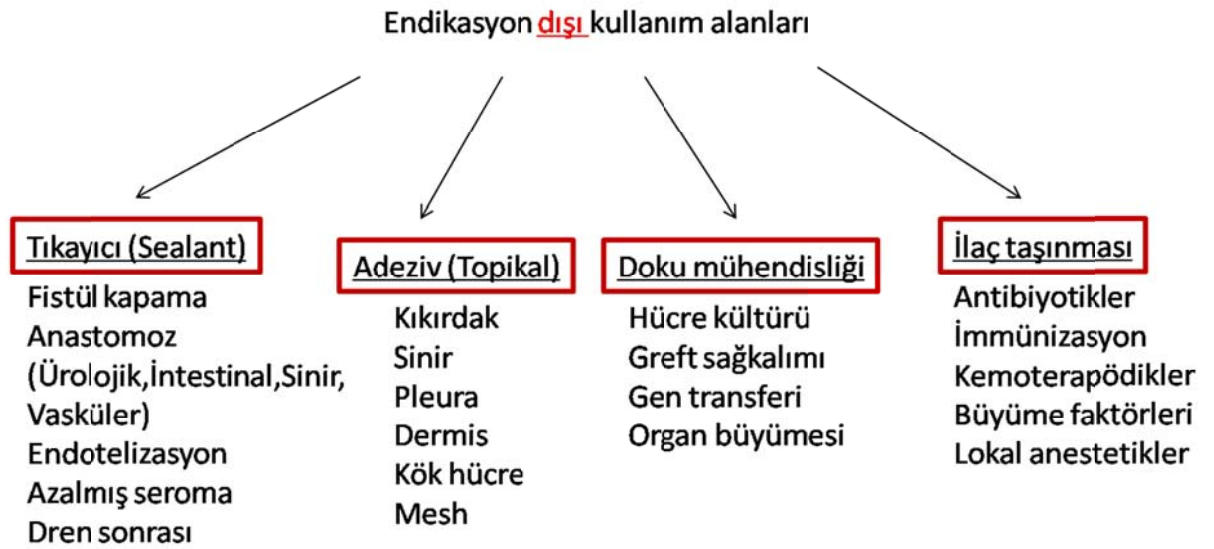
Literatürde son yıllarda, bazı ilaçların (büyüme faktörleri, kemoterapötikler, lokal anestetikler) hedef bölgelere taşınması ve doku mühendisliği (gen transferleri, hücre kültürleri) alanlarında yoğun bir araştırma sürmekte ve kullanım alanları her geçen gün genişlemektedir.^{4,25,28,46,47}



Şekil 4: Literatürde tanımlanan tam kandan TZP, TFP ve trombin elde etme protokolü



Şekil 5: Amerika'da trombosit fakir plazmanın (fibrin yapıştırıcı) FDA tarafından onaylanmış kullanım alanları



Şekil 6: Trombositten fakir plazmanın (fibrin yapıştırıcı) literatürde tanımlanmış endikasyon dışı kullanım alanları

2.2 BOTULİNÜM A TOKSİNİ (BTX-A)

Botulinum toksini gram (+) anaerobik bir bakteri olan Clostridium Botulinum tarafından üretilen ve insan için en potent toksindir. İnsan sinir sistemi toksinin 5 farklı serotipine duyarlıdır (BTX-A, B, E, F, G). Toksin botulizm olarak bilinen klinik tabloya yol açmaktadır ve besin kaynaklı, infantil, yara kaynaklı ve inhalasyon kaynaklı olmak üzere 4 farklı formda görülebilmektedir.⁴⁸

Botulizm klinik olarak görme bozukluğu, yutma güçlüğü, eklem ağrısı, motor ve otonomik sinirleri etkileyen simetrik aşağı doğru ilerleyen flask paralizi, solunum depresyonu ve en sonunda ölümle sonuçlanan bir tabloya yol açmaktadır.

Tarihsel olarak toksinin keşfi 1897 yılında Belçikalı araştırmacı Van Ermengem tarafından yapılmış olup toksin kontamine olmuş bir etten izole edilmiştir. 2. Dünya savaşı sırasında toksinin biyolojik silah olarak kullanımı amaçlı çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. Scott botulinum toksininin kas paralizisi etkisi ve güvenilir doz aralığını araştırmış ve 1981 yılında strabismus tedavisi için toksin uygulaması gerçekleştirdiği 20 hastalık serisini yayınlamıştır.⁴⁹ Toksinin kozmetik amaçlı kullanımı ilk olarak 1987 yılında Jean Carruthers ve Alistair Carruthers tarafından glabella ve kaz ayakları için tanımlanmıştır.⁵⁰ Ancak toksinin glabellar bölge için kullanım onayı FDA (Food and Drug Administration) tarafından çeşitli toksin alt tipleri için farklı yıllarda olmakla birlikte ilk olarak 2002 yılında verilmiştir.

2014 ASAPS (The American Society for Aesthetic Plastic Surgery) verilerine göre yılda ortalama 3.5 milyondan fazla botulinum toksin uygulaması yapılmaktadır ve cerrahi olmayan girişimler içinde en sık yapılan uygulamadır.⁵¹Toksinin kozmetik alan dışında servikal distoni, blefarospazm, hiperhidrozis, oftalmolojik ve otolaringolojik alanlarda da kullanımı söz konusudur (**Tablo2**).

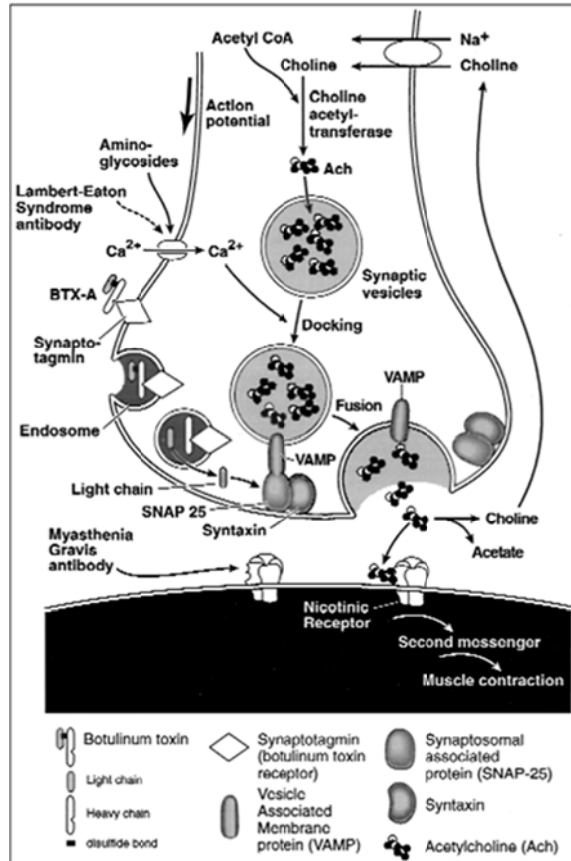
Tablo 2: Botulinum toksinin çeşitli kullanım alanları

Nöroloji	Oftalmoloji	Otolaringoloji	Plastik cerrahi	Üroloji	Gastrointestinal Proktoloji	Algoloji	Jinekoloji
Servikal distoni	Strabismus	Spazmodik disfoni	Kırıksıklık tedavisi	Hiperaktif mesane	Akalazya	Migren tipi ağrı	Vajinismus
Blefarospazm	Timsah gözyaşı	Bruksizm	Hiperhidrozis	Detrüsör dissinerjisi	Anal fissür		
Hemifasiyal spazm	Lagoftalmus	Rinit	Migren tipi ağrı	Prostat hipertrofisi			
Oromandibuler distoni		Sialore	Timsah gözyaşı	Sfinkter spastisitesi			
Yazıcı krampı			Bruksizm				
Tardif diskinezi			Frey sendromu				
Tourette sendromu							
Diğer spastik bozukluklar							

NÖROMUSKULER TRANSMİSYON, BOTULİNÜM TOKSİNİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE ETKİ MEKANİZMASI

Botulinum toksininin etki mekanizmasını anlaşılabilmesi için kolinerjik kavşaktaki fizyolojik nöromuskuler transmisyon basamaklarının bilinmesi gerekmektedir.

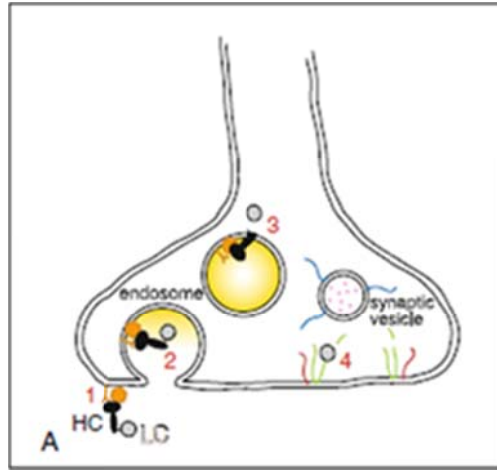
Temelde kolinerjik nörotransmisyon, asetilkolinin sentezi, depolanması, salınımı, hedef bölgeye bağlanma, yıkım ve geri dönüşüm olmak üzere toplamda 6 basamaktan oluşan bir süreçtir (Şekil 7).⁵²



Şekil 7: Kolinerjik nörotransmisyonun basamakları⁵² (Wilber Huang, MD, et al., Pharmacology of botulinum toxin J Am Acad Dermatol 2000;43:249-59.)

Botulinum toksininin 8 farklı serotipi (A, B, C1, C2, D, E, F, G) bulunmakta olup bu proteinlerin ortalama moleküler ağırlığı 150 kDa'dur. Botulinum toksini tek polipeptit zinciri yapısında sentezlendikten sonra intrasellüler veya ekstrasellüler proteazlar aracılığı ile 100 kDa ağırlığındaki ağır zincir ve 50 kDa ağırlığındaki hafif zincirden oluşan dimer yapısına dönüşür. Toksinin etkinliğini gösterebilmesi için hem ağır hem de hafif zincire ihtiyaç vardır Bu iki zincir birbirine ısıya karşı duyarlı disülfid bağları ve non-kovalent güçlerle bağlanmıştır.⁵³⁻⁵⁷ Botulinum sporları çevresel etmenlere karşı dayanıklı olsa da toksin sıcaklık ve pH değişimlerine karşı oldukça hassastır. Toksin 80 ° C' de 6 dk. içinde inaktif olur.⁵²

Botulinum toksini hedef hücrede 4 aşamadan oluşan bir mekanizma ile etki eder(Şekil 8).⁵⁸



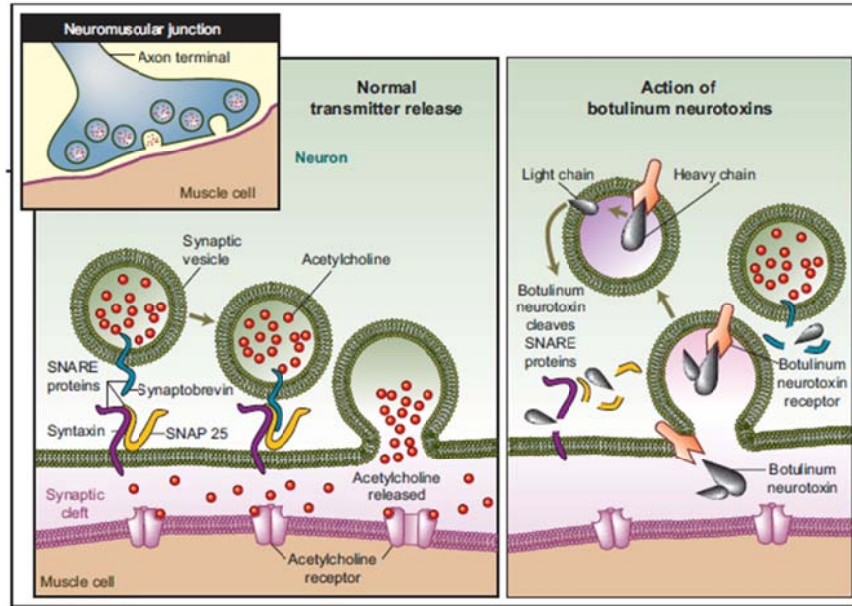
Şekil 8: Botulinum intoksikasyonunun 4 aşamalı modeli (Jankovic J., et al., Botulinum Toxin Therapeutic Clinical Practice and Science 1st Edition, Elsevier Saunders, 2009.)

1) Bağlanma: Toksin presinaptik kolinerjik reseptörlere ağır zincirde yer alan 50 kDa karboksil terminali aracılığı ile bağlanmaktadır. Toksinin alt tipleri bağlanma için farklı reseptörleri kullanmaktadır.

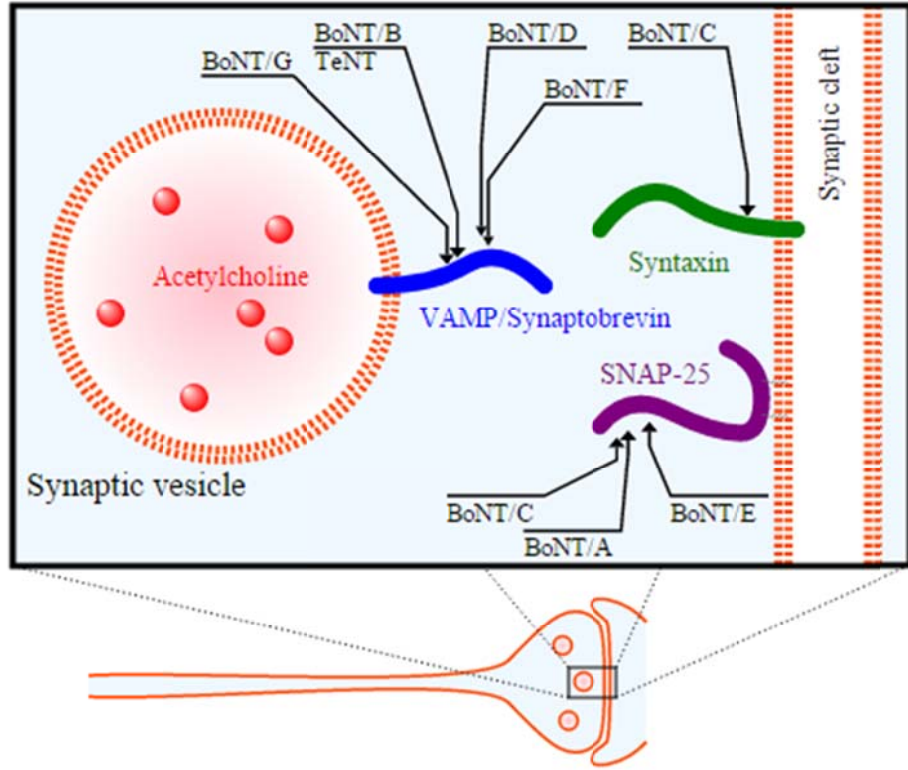
2) İnternalizasyon: İkinci aşama reseptör aracılı endositozdur. Toksin endositoz için sinaptik vezikül protein (SV2) ve gangliozidleri reseptör olarak kullanmaktadır.

3) Translokasyon: Endositoz sonrası toksindeki ağır zincirin 50 kDa'luk amino terminali vezikül içinde hem iyon kanalı oluşturup ortam pH'sını düşürür hem de pH değişikliği sonucu konfigürasyonu değişen hafif zincirin vezikülden sitoplazmaya translokasyonunda rol oynar.

4) Nörotransmitter (asetilkolin) salımının inhibisyonu: Presinaptik terminalde yer alan asetilkolin içeren sinaptik veziküllerin plazma membranına füzyonunda SNARE protein kompleksi görev almaktadır. Sintaksin, synaptobrevin ve SNAP-25 (Synaptosome associated protein of 25 kDa) SNARE protein kompleksini oluşturmaktadır. Botulinum toksininin hafif zinciri çinko (Zn^{+2}) bağımlı metalloprotez aktivitesine sahip olup bu protein kompleksinin kırılmasına yol açar. Bunun sonucunda nöromusküler kavşakta veya ekrin ter bezlerindeki otonomik sonlanmalarda asetilkolin salınımı gerçekleşmemekte ve nörotransmisyon inhibe olmaktadır (**Şekil 9**).⁵⁹ Her bir botulinum toksin serotipi SNARE protein kompleksinde farklı alanları kırar. Serotip A ve E SNAP-25'i, Serotip B, D, F ve G synaptobrevini, Serotip C ise SNAP-25 ve Sintaksini kırar (**Şekil 10**).⁶⁰



Şekil 9: Botulinum toksininin etki mekanizması (Dickerson JT, Janda KD. The use of Small Molecules to Investigate Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets for Treatment of Botulinum Neurotoxin A Intoxication. ACS Chem Biol. 2006; 1(6):359-69.)

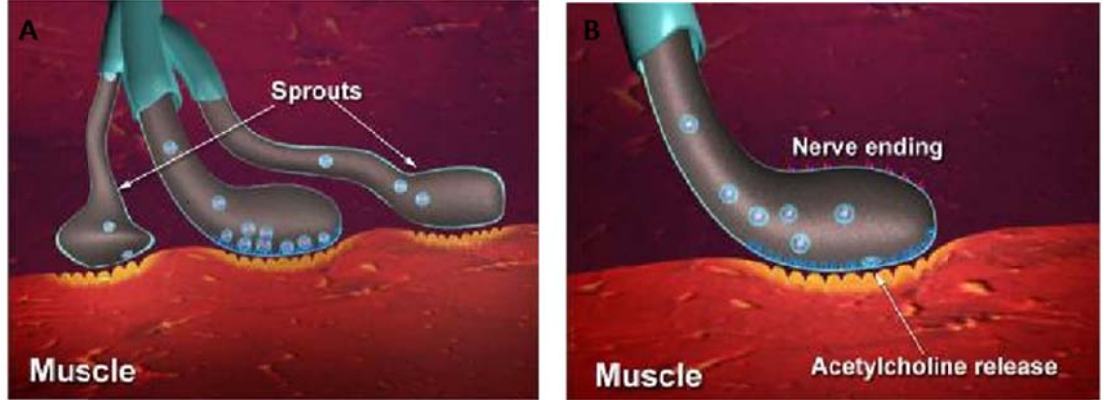


Şekil 10: Botulinum nörotoksinin SNARE kompleksindeki hedef molekülleri (Barr,John R.Botulinum Neurotoxin Detection and Differentiation by Mass Spectrometry. Emerging Infectious Diseases 2005; 11(10):1578–83.)

Botulinum toksin enjeksiyonu sonrası oluşan denervasyonun sinir terminallerindeki rejenerasyon sonucu geri dönmektedir. Rejenerasyon 2 aşamadan oluşmaktadır.

1. aşama (Erken faz): İnaktive haldeki postsinaptik terminalden salınan büyüme faktörleri presinaptik bölge sinir terminalinde yeni aksonal tomurcuklanmalara neden olur. Oluşan bu tomurcuklanmalar immatür sinapsları meydana getirir ve rejenerasyonun erken fazından sorumludur. 2-3 hafta içinde bu bölgelerden iletim başlar.

2. aşama (Geç faz): Yeniden innervasyon sağlanır ve bunun sonucunda erken fazda oluşmuş olan aksonal filizlenmeler regrese olarak bu bölgelerden olan iletim durur. Ortalama 3-6 ay içerisinde tamamlanır (**Şekil 11**).⁶¹



Şekil 11: Erken dönem presinaptik terminalde aksonal tomurcuklanma (A). Geç dönem aksonal tomurcuklanmada regresyon ve reinnervasyon (B). (Botox[®] prescribing information, March2010. Available at: http://www.allergan.ca/Assets/pdf/botox_mechanism_of_action.pdf)

BOTULİNUM TOKSİN İNHİBİTÖRLERİ

Botulinum toksini etkisini bağlanma, internalizasyon, translokasyon ve inhibisyon aşamalarından oluşan çok basamaklı bir mekanizma üzerinden gerçekleştirmektedir. Toksin inhibisyonunun temeli bu aşamalardan herhangi birisinin blokajı esasına dayanmaktadır ve bu amaç için literatürde tariflenmiş birçok ajan bulunmaktadır (**Tablo 3**).⁵⁹⁻⁶⁵

Tablo 3: Literatürde tanımlanmış bazı botulinum toksin antagonistleri

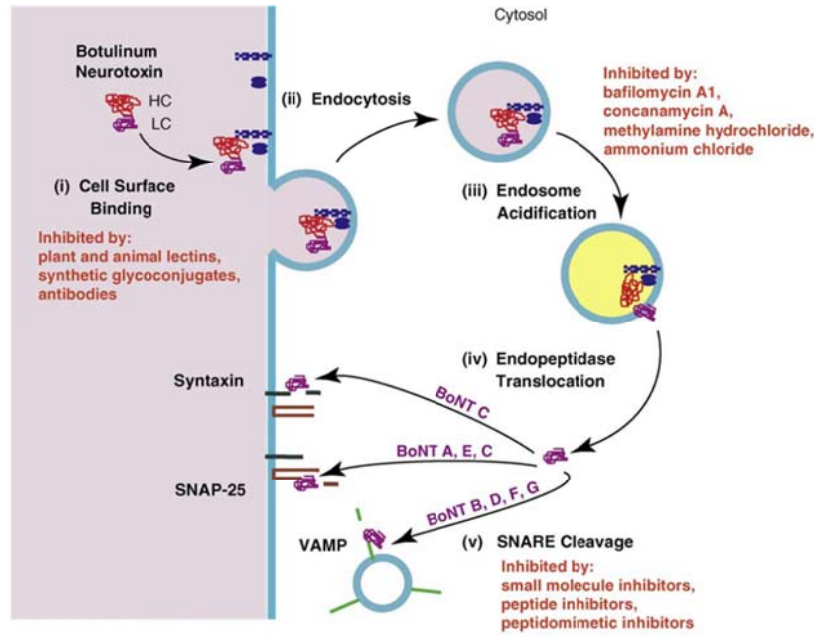
İNHİBİTÖR AJAN	ETKİ ETTİĞİ BASAMAK	ETKİ MEKANİZMASI
Lektin	Bağlanma	Toksin reseptörüne yarışmalı bağlanır
Proton iyonoforlar, Nigerisin, Monensin, Klorokin, Kinolonlar	İnternalizasyon, Translokasyon	Vezikül içi pH ↑, translokasyon inhibisyonu
Amonyum klorid, Metilamin hidroklorid	İnternalizasyon, Translokasyon	Toksine bağlanma, toksinin etkinliğini yavaşlatma
Aminopiridinler	İnternalizasyon, Translokasyon	Presinaptik terminalde K^+ blokajı, hücre içine Ca^{2+} akışı Asetilkolin salınımında ↑
Bis (5-amidino-2-benzimidazolyil)	İnhibisyon (Asetilkolinin parçalanması)	Hafif zincirdeki Zn^{2+} kofaktörünü koparır, proteolitik aktivite ↓
Benzylidene siklopentenedione	İnhibisyon (Asetilkolinin parçalanması)	Toksinin proteolitik kısmının kovalent modifikasyonu sonucu geri dönüşümsüz inhibisyon

Bu ajanların birçoğu kimyasal yapısı, toksik özellikleri ve güvenilir doz aralıklarının dar olması nedeniyle terapötik olarak kullanımları sınırlıdır.

Özellikle internalizasyon ve toksinin translokasyon fazında etkili olan ajanlar toksinin etkisini geçici olarak durdurabilmektedir. Capkova ve ark. 2010

yılında toksinin ilk geri dönüşsüz inhibisyonuna yol açan Benzylidene siklopentenedione isimli kimyasal maddeyi tanımlamıştır.⁶⁶

Son 15 yıl içerisinde, SNARE protein kompleksinin proteolizi üzerinde birçok araştırma yapılmıştır ve bu alanda kullanılan maddeler toksinin aktif bölgesinin inaktivasyonu prensibine dayanarak etki etmektedir. Peptid ve peptidomimetik yapıdaki inhibitörler bu maddelerden bazılarıdır (Şekil 12).



Şekil 12: Botulinum toksinin inhibitörleri ve etki ettiği basamaklar (Hakami RM, et al., Gaining ground: assays for therapeutics against botulinum neurotoxin. Trends Microbiol. 2010 Apr;18(4):164-72.)

Kliniğimizde Bulam ve ark. tarafından 2013 yılında yapılmış olan bir çalışmada trombositten zengin plazma mezoterapisinin botulinum toksini ile eş zamanlı uygulanması durumunda da toksinin paralitık etkisinde azalma olduğu saptanmıştır.¹⁵

Botulinum toksini tüm bu maddelerin dışında antikor aracılığı ile de inhibe olabilmektedir.⁶⁷Toksin, toksik olan ve daha büyük oranda da toksik olmayan proteinlerden oluşur. Tüm bu proteinler vücut için yabancı antijen görevi görmekte ve antikor oluşumunu tetikleyebilmektedir. Toksik olmayan kısma karşı oluşan antikorlara nötralizen olmayan antikor adı verilmekte ve etkileri henüz tam olarak bilinmemektedir. Toksik kısma karşı oluşan antikorlara ise nötralizan antikor adı verilir ve tedavi başarısızlığı ile tedaviye dirençten primer sorumlu olan antikorlardır. Bu antikorların oluşumunda toksinin yüksek dozlarda ve sık aralıklarla yapılması etkilidir. Uygulama süresinin minimum 12 hafta ile sınırlı tutulması ve etkili olan en düşük dozun kullanılması antikora bağlı direncin gelişimini engelleyebilir.⁶⁸

BOTULİNUM TOKSİN AKTİVATÖRLERİ

Schmidt ve Bostian tarafından 1997 yılında yapılan in vitro bir çalışmada botulinum toksininin sığır serum albumini ile muamele edilmesi sonucu, kinematik analizde toksinin SNAP-25 proteinlerini daha etkili bir şekilde kırdığından bahsedilmiştir. Çalışmada 1mg/ml konsantrasyonda sığır serum albumin ilavesi toksinin katalitik etkisini 10 kat arttırmıştır. Bu etkinin albuminin non spesifik stabilizatör etkisinden kaynaklanabileceği öngörülmüştür.⁶⁹

Albumin dışında literatürde 2-achylguanidyl-5-phenil thiophene isimli madde botulinum toksin aktivasyonu için asellüler ortamda başarılı ile aktivasyonda kullanılmış ve otörler tarafından süperaktivatör olarak tanımlanmıştır.⁷⁰

Bu bulguların ışığında, toksinin formülasyonu yukarıda bahsedilen maddeler ile modifiye edildiğinde, toksinin terapödik olarak daha etkili kullanımına olanak sağlayabilir. Daha az toksin kullanımı ile optimal terapödik kazanım, toksin kaynaklı yan etki insidansında azalma, daha az enjeksiyon seansları ve tedaviye direnç gelişme olasılığında düşüş bu yolla elde edilebilecek faydalardan bazılarıdır.

Botulinum toksin biyoaktivasyonuna yönelik yapılmış çalışmaların çoğu in-vitro ortamda hücresel ve moleküler düzeylerde gerçekleştirilmiş olup konu ile ilgili klinik çalışmaların literatürde kısıtlı olması, çalışmamızın çıkış noktasını oluşturmuştur.

BOTULİNUM TOKSİN DOZ ÖNERİLERİ VE SAKLAMA KOŞULLARI

Botulinum toksin tip A klinik uygulamada en sık kullanılan serotiptir. Ticari olarak toksinin piyasada Botox® (Allergan Pharmaceuticals Inc, Irvine, CA) ve Dysport® (Ipsen Pharmaceuticals Ltd, Dublin, Ireland) isminde 2 formu bulunmaktadır. Bir MU (Mouse Unit) 18-20 gr' lık Swiss-Webster (LD₅₀) farelerine toksinin intraperitoneal yoldan verildikten sonra farelerin %50'sinde 3-4 gün içinde ölüme yol açan doz miktarı olarak tarif edilir. Bir flakon Botox® içinde 100MU botulinum toksin tip A, 0.5 mg insan albumini ve 0.9 mg sodyum klorid bulunur. Bir flakon Dysport®'un içinde ise 500 MU botulinum toksin ve 125µg insan albumini bulunur. 1 MU Botox® ortalama 3-5 MU Dysport®'a tekabül eder. Toksin flakon içinde steril vakumlu kurutulmuş halde bulunur. Üretici firma

tarafından sulandırma öncesi Botox® 'un -5°C' de Dysport® 'un ise + 2-8°C' de saklanmasını önerir buradaki saklama koşullarındaki farklılık, Botox® 'un presipitasyonla Dysport® 'un ise saflaştırma yöntemi ile üretilmesinden kaynaklanmaktadır.

Sulandırma için fizyolojik salin solüsyonu önerilmektedir ve sulandırıldıktan sonra her 2 üründe + 2-8°C' de muhafaza edilmelidir. Sulandırılan toksinin üretici firma tarafından 4 saat içinde kullanılması önerilmektedir. Literatürde toksini saklama koşulları ve süresi ile etkinlik analizi açısından birçok çalışma yapılmıştır ancak bu çalışmalar arasında bir tutarlılık söz konusu değildir. Elmas ve ark. 2007 yılında yapmış olduğu bir çalışmada 2 haftalık sulandırılmış toksinin, taze sulandırılmış toksine kıyasla etkinlik açısından bir farkının olmadığı ancak toksinin etki süresinin kısaldığı saptanmıştır.⁷¹

BOTULİNUM TOKSİN YAN ETKİLERİ

Yan etkiler genelde tolere edilebilir ve az oranda hasta grubunda görülmektedir. Enjeksiyona bağlı ağrı, lokal ödem, eritem, geçici parestezi, baş ağrısı ve hafif bulantı görülebilir. Bunların çoğu genelde enjeksiyona bağlı stres ve zayıf enjeksiyon tekniği nedeniyle görülmektedir. Baş ağrısı enjeksiyona bağlı travma ve periost irritasyonu ile bağlantılı olabilir. En korkulan yan etkilerden birisi istenmeyen kas grubu paralizisidir. Literatürde hastaların ortalama %1-3'ünde göz kapağı pitozu gözleendiği belirtilmiştir.

Botulinum toksin preparatlarındaki albumin potansiyel bir alerjen olmasına rağmen literatürde tanımlanmış ciddi bir alerjik reaksiyon vakasına

rastlanmamıştır. Sistemik yan etkiler oldukça nadirdir, ancak toksinin damar içi enjeksiyonu botulizm benzeri tabloyu taklit edebilir. Bunların dışında grip benzeri tablo ve muhtemel immun aracılıklı olduğu düşünülen brakial pleksopati tablosu bildirilmiştir. Bir hastada mesane disfonksiyonu ve immunsuprese bir hasta da enjeksiyon sonrası nekrotizan fasiit tablosu bildirilmiştir. Toksinin uzun dönemde herhangi bir zararlı etkisi tespit edilmemiştir.⁷²⁻⁷⁵

2.3 TAVŞANLARDA BOTULİNUM TOKSİN DENEYLERİ

Tavşanlar üzerinde botulinum toksin deneyi ilk olarak 1953 yılında yapılmıştır.⁷⁶ 1960 ve 1970'lerde toksinin etki mekanizması ve serotiplendirilmesi ile ilgili çalışmalar devam etmiştir. 1980'lerde toksinin klinik uygulamaya girişi ile birlikte duyarlılık çalışmaları, göz içi uygulamaları yaygın olarak yapılmıştır.⁷⁷

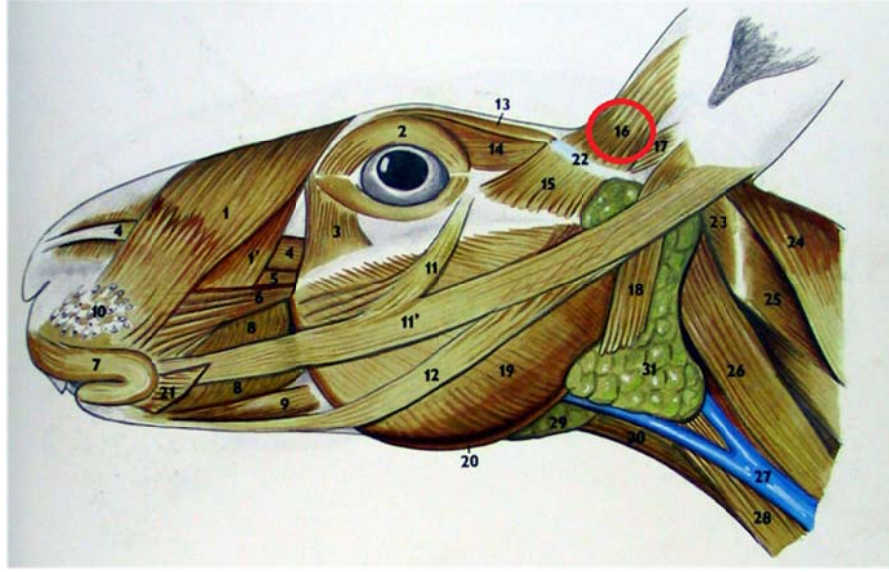
2003 yılında Jabor ve ark. tarafından tavşan kulağında toksinin hazırlanma ve saklanma koşullarına göre etkisi değerlendirilmiş, toksinin tavşan kulağında parolitik etki oluşturacak minimum etkin dozunun 2.5 U olduğu bulunmuştur.⁷⁸

Çalışmada değerlendirme için görsel ve elektrofizyolojik parametreler kullanılmıştır. 2006 yılında Görgü ve ark. tavşan kulağında botulinum toksininin lokal anestetik ajanlarla olan etkileşimini değerlendirmiştir.⁷⁹ 2007 yılında Elmas ve ark. yine tavşan kulağında toksinin sulandırıldıktan sonra bekletilme süresi ile etkinlik arasındaki ilişkiyi değerlendirmiştir.⁷¹ 2013 yılında Bulam ve ark. tavşan kulağında trombosit zengin plazma mezoterapisi ile botulinum toksin uygulamasının arasındaki ilişkiyi değerlendiren bir araştırma yapmıştır.¹⁵

2.4 TAVŞAN AURİCULAR KAS ANATOMİSİ VE DENEY MODELİ

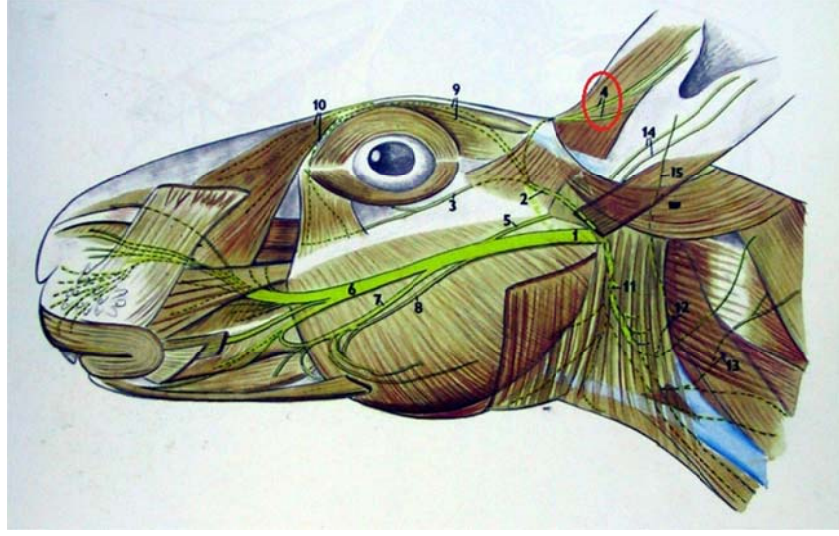
Literatürde tavşanlarda botulinum toksini etkinliği için yapılmış olan çalışmalarda, kulak bölgesi hem enjeksiyonun kolay olması ve hem de toksinin kulak statik pozisyonunda belirgin değişiklik oluşturabilmesi nedeniyle sık tercih edilen bölgelerden birisi olmuştur.⁷⁸

Daha önceden yapılmış olan kadavra çalışmalarında tavşan kulağında 3 ana kas grubunun bulunduğu gösterilmiştir. Anterior, medial ve lateral kas grupları kulak pozisyonunu değiştirmekle birlikte, bu kaslardan anteriorda olan grup daha belirgin kas kitlesi içermektedir, lateraldeki kas grubu, ise daha küçük bir kas kütlesine sahiptir. Anteriordaki kas grubu hacimli kütlesi ve dışarıdan palpasyonla kolay hissedilebilmesi nedeniyle enjeksiyona uygun tek kas grubudur. Anterior aurikuler kas grubu frontal kemikte medial kantusun 2 cm kranialinden orijin alır ve ipsilateral kulağın ventromedial sınırına (kulak bazisinden 3 cm uzağa) yapışır. (Şekil 13: 16. m. scutuloauricularis superficialis dorsalis).⁸⁰ Bu kasın paralizisi kulakta düşüklük, kulağı öne kaldıramama ile sonuçlanmaktadır. Medial ve lateral kas grupları kulağın kısmen hareketinin korunmasını sağlar.



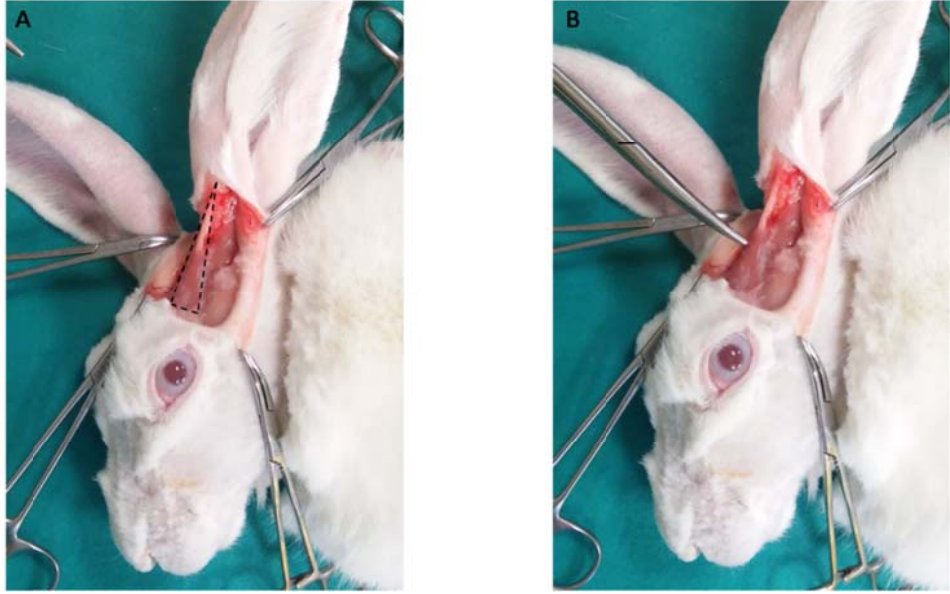
Şekil 13: Tavşan yüz ve boyun kaslarının anatomisi. M. scutuloauricularis superficialis dorsalis (16), m. scutuloauricularis superficialis ventralis (17), m. parotidoauricularis (18), m. zygomaticus portio auricularis (11') kulak hareketlerinden sorumlu kaslardır. (A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals. Peter Popesko, et al., Wolfe Publishing Ltd. 1990. Sayfa 18)

M. scutuloauricularis superficialis dorsalis'in innervasyonu fasiyal sinirin rami auriculares rostrales dalı tarafından innerve olur (**Şekil 14**).⁸⁰



Şekil 14:Fasiyal sinir ve dalları. N. facialis (1), n. auriculopalpebralis (2), rami auriculares rostrales (4) (A Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals. Peter Popesko, et al., Wolfe Publishing Ltd. 1990. Sayfa 22)

Çalışma öncesinde enjeksiyonun yapılacağı anterior aurikuler kas anatomisi kadavrada kas disseksiyonu ile ortaya konmuştur (Şekil 15, Şekil 16).



Şekil 15:Kadavra tavşan anterior aurikular kas disseksiyonu (lateral görüntü). Çizgili hattın içinde kalan alan anterior aurikular kasın sınırları (A). Metzenbaum makasın ucu anterior aurikular kası göstermekte (B)



Şekil 16: Kadavra tavşan anterior aurikular kas disseksiyonu (tepeden görüntü). Çizgili hattın içinde kalan alan anterior aurikular kasın sınırları (A). Metzenbaum makasın ucu anterior aurikular kası göstermekte (B).

2.5 ALBUMİN MOLEKÜLER YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

Serum albumini tüm omurgalı canlılarda bulunan suda çözünebilir ~65 kDa ağırlığında, globuler ve monomerik yapıda bir proteindir. Memeli canlılarda, albumin kimyasal yapı olarak birbirlerine benzer özellik gösterir. Karaciğerde üretilip dolaşımında plazma içinde çözünmüş halde bulunur. Kanda bulunan proteinlerin %60'ını oluşturur. Dolaşımında yaratmış olduğu onkotik basınç sebebiyle vücut sıvılarının dolaşım ve dokular arasında belli bir dengede tutulmasından sorumludur. Bunun yanı sıra dolaşımında bazı maddeler için plazma taşıyıcısı olarak görev alır (Örn: steroidler, tiroid hormonları, hemin, yağ asitleri) (Tablo 4).

Tablo 4: Albuminin fonksiyonları

<u>Fonksiyon</u>
Onkotik basıncın idamesi
Tiroid hormonu ve diğer yağda çözünen hormonların taşınması
Serbest yağ asitlerinin taşınması
Unkonjuge bilirubinin taşınması
İlaç taşınması (Örn: botulinum toksin)
Ca ²⁺ bağlanması
pH ayarlanması
Negatif akut faz reaktanı

İlk olarak 19. yüzyılda keşfedilmiş ve serumdaki miktarı takiben protein yapısında olduğu keşfedilmiştir. 1976 yılında aminoasit dizilimi tanımlanmış ve 1992 yılında ise 3 boyutlu konfigürasyonu bulunmuştur. Günümüzde albumin %5-25 konsantrasyonlarında serum albumin solüsyonu şeklinde terapötik amaçlı olarak kullanılabilir. Genellikle kan hacminin idamesinde, yanık, travma ve cerrahi hastalarında yaygın kullanımı söz konusudur. Son yıllarda albumin ile ilgili biyomoleküler düzeydeki çalışmalar oldukça yoğunlaşmıştır. İlaçların, terapötik protein ve nükleik asitlerin biyodağılımı, biyoyararlanımlarının ve dolaşımdaki yarılanma ömürlerinin uzatılması, üzerinde çalışılan konulardan bazılarıdır.

Ticari botulinum toksini preparatlarının içerisinde de albumine yukarıda sayılan bu özelliklerden dolayı rastlamak mümkündür. Albumin fraksiyonunun buradaki esas fonksiyonu toksinin stabilizasyonu ve toksin adsorbsiyonunu engellemektir. Literatürde albumin konsantrasyon değişikliği ile toksin etkinliğini değerlendiren sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmıştır.^{13,14,81} Bu çalışmaların çoğu yüksek dozda toksin gerektiren nörolojik hastalıklar için yapılmış olup, elde edilen verilerde toksine ekstra albumin ilavesi durumunda toksinin daha düşük dozda ve daha etkili bir şekilde kullanılabileceği yönünde sonuçlar elde edilmiştir.

Klinik çalışmalar sınırlı hasta grubunda, deneysel çalışmalar ise in vitro ortamda gerçekleştirilmiştir. Toksin içindeki albumin konsantrasyonunun değiştirilmesi ve etkinlik arasındaki ilişki günümüzde halen daha anlaşılmaya çalışılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 DENEY HAZIRLIKLARI

Çalışma T.C Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından 23/06/2015 tarih G.Ü.ET-15.044 sayılı izin ile onay verilmiştir. Çalışma Gazi Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Denekler Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilmiştir.

Çalışmada 2500-3000 gr arasında minimum 4 aylık olan 24 adet Yeni Zelanda beyaz tavşanı kullanılmıştır. Denekler 22 $\pm$ 2°C sıcaklıkta 12 saat aydınlık ve karanlık periyotları olan, hava akımı açısından uygun şartlarda ve uygun kafeslerde serbest yem ve su ile beslenerek barındırılmıştır. İkili gruplar halinde uzman veterinerler kontrolünde izlenmiştir. On gün karantina süresi beklenmiştir. Her hayvanın inguinal bölgesi kan alma işlemi öncesi tıraşlanıp hazırlanmıştır. Hayvanları işaretlemek için her hayvanın kulak iç yüzü işaretleme için kullanılmıştır.

Anestezi için %10'luk ketamin HCl (45mg/kg-Alfamine® intramuskuler) ve %2'lik ksilazin HCl (5mg/kg alfazyne® intramuskuler) kullanılmıştır.

Karantina süresi boyunca herhangi bir hayvan kaybı söz konusu olmamıştır.

3.2 ÇALIŞMA GRUPLARI

24 denek her grupta 6 denek olacak şekilde 4 gruba ayrılmıştır. 24 denekte 24 tane sağ kulaktaki aurikuler kasa aşağıdaki bahsedilen işlemler yapılmıştır. Her bir denneğin sol kulağı sağ kulağının kontrolünü oluşturmuştur.

Grup 1 (Çalışma grubu) (n=6): Sağ anterior aurikuler kasa 2cc serum fizyolojik ile sulandırılmış 100 U Botulinum A Toksininden 2.5 U (0.05cc) intramuskuler enjeksiyon uygulandı.

Grup 2 (Çalışma grubu) (n=6): 2cc serum fizyolojik, içerisinde %0.1 konsantrasyonda albumin içerecek şekilde hazır tavşan albumini ile karıştırılmıştır. Takiben bu karışımla 100U Botulinum A Toksini sulandırılmış ve toksinden 2.5 U (0.05cc) sağ anterior aurikuler kasa intramuskuler enjeksiyonla uygulanmıştır.

Grup 3 (Çalışma grubu) (n=6): Bu gruptaki tavşanların her birinin femoral arterinden 5cc kan alınarak santrifüj işlemleri sonucunda toplamda 2cc trombositten fakir plazma elde edilmiştir. Elde edilen bu plazma ile 100U Botulinum A Toksini sulandırılmış ve her bir tavşanın sağ anterior aurikuler kasına 2.5U (0.05cc) intramuskuler enjeksiyonla uygulanmıştır.

Grup 4 (Kontrol grubu) (n=6): Sağ anterior aurikuler kasa 2cc serum fizyolojik intramuskuler yolla enjekte edilmiştir.

Tablo 5: Deney gruplarının oluşturulması

<u>Gruplar</u>	<u>Toksini sulandırma yöntemi (100U BTxA)</u>	<u>Enjeksiyon hacmi</u>
1 (Çalışma grubu)	2cc serum fizyolojik	0.05cc (2.5U)
2 (Çalışma grubu)	2cc %0.1 konsantrasyonda hazır tavşan albumini ve serum fizyolojik çözeltisi	0.05cc (2.5U)
3 (Çalışma grubu)	2cc otolog trombositlen fakir plazma	0.05cc (2.5U)
4 (Kontrol grubu)	Toksin (-)	0.05cc serum fizyolojik

3.3 BOTULİNÜM TOKSİN TİP-A' NİN HAZIRLANMASI

Çalışma grubundaki hayvanlarda BOTOX® 100U (Allergan Pharmaceuticals Inc, Irvine, CA) flakon kullanılmıştır (**Şekil 17**). Çalışma gruplarına göre toksin yukarıda daha önceden bahsedildiği gibi sulandırılarak hazırlanmıştır (**Tablo 5**). Literatürde daha önceden yapılmış olan çalışmalarda, 2.5U Botulinum A Toksininin tavşan anterior aurikuler kasında tam paraliziye yol açan minimum güvenli doz olduğu saptanmıştır.⁷⁸ Çalışmamızda da çalışma grubundaki tavşanlara 2.5U Botox® (Allergan Pharmaceuticals Inc, Irvine, CA) intramuskuler olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyonlar 30-gauge enjektörler kullanılarak yapıldı.



Şekil 17: Çalışmada Botulinum A Toksin preparatı olan BOTOX[®] kullanılmıştır.

3.4 TAVŞAN ALBUMİNİN HAZIRLANMASI

Grup 2'de yer alan her hayvana Botulinum A Toksini enjeksiyonu öncesi %0.1 lik konsantrasyonda ve serum fizyolojik içinde çözünmüş albumin solüsyonu hazırlanması planlandı. Tavşandan otolog olarak kayda değer miktarda (2cc) saf albumin eldesi mümkün olmadığı gibi maliyeti de oldukça yüksek bir yöntemdir. Dolayısıyla deneysel model oluşturulurken toksinin sulandırılması için hazır tavşan albuminin kullanılması planlandı. Bu amaçla liyofilize toz şeklinde %99 saflıkta globulin içermeyen tavşan albumini (Kat no: A0764 SIGMA ALDRICH[®] St. Louis, Missouri, ABD) deney için tercih edildi (**Şekil 18**).



Şekil 18: Deneyde kullanılan saf hazır tavşan albumini

Hazır albumin literatürdeki daha önceden yapılmış benzer çalışmalar baz alınarak %0.1'lik konsantrasyonda hazırlanması planlandı.^{13,14,81} Bu amaçlı 1000cc serum fizyolojik 1 gr hazır albumin ile muamele edilip %0.1'lik konsantrasyonda bir çözelti elde edildi. 100 U Botox[®], elde edilen bu çözeltiden 2cc alınarak sulandırıldı.

3.5 TROMBOSİTTEN FAKİR PLAZMANIN HAZIRLANMASI

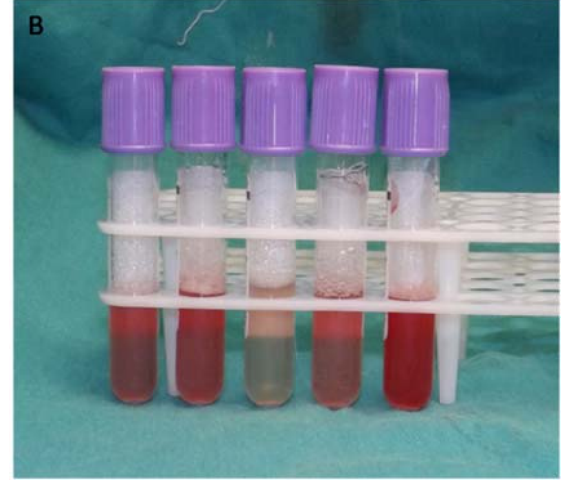
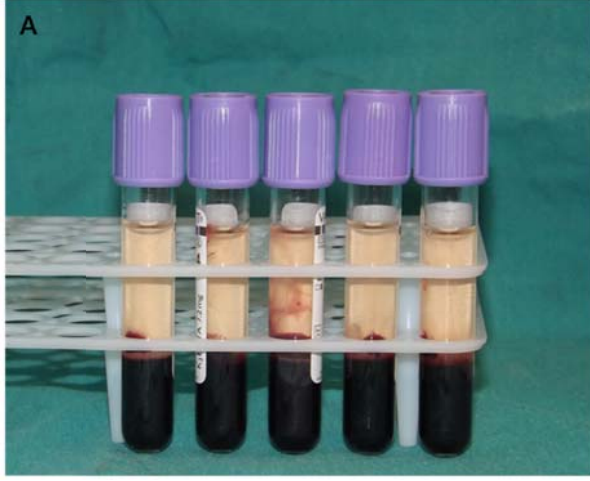
Grup 3'te yer alan her hayvanın otolog trombositlen fakir plazmasının hazırlanması planlanmıştır. TFP 2012 yılında Franco ve arkadaşları tarafından çalışma baz alınarak hazırlanmıştır.^{25,26,82} Her hayvanın inguinal bölgesinden girilip femoral arterinden 5cc kan alınmıştır.

Kanın santrifüjü için Centronic-BL P SELECTA[®] cihazı kullanılmıştır (**Şekil 19**).Takiben elde edilen numuneler sitratlı tüp içerisinde 1500 rcf (G-force)'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. 15 dakika sonunda üstte kalan süpernatant kısım yeni bir sitratlı tüpe aktarıldıktan sonra ikinci kez 1500 rcf (G-force)'de 15 dk boyunca santrifüj edilmiştir. İkinci santrifüj sonrasında üstte kalan 3/4'lük kısım

yeni bir tüpe alınıp trombosit sayımı için teste tabii tutulmuştur. Trombosit sayımı $<10.000/uL$ gelen plazmalar kullanım için ayrılırken, trombosit sayımı $>10.000/uL$ olan numuneler 3. kez santrifüj edilmiştir. Tüm tavşanlardan elde edilen plazmaların trombosit sayımı sonucu $<10.000/uL$ olduğundan emin olunduktan sonra, trombositten fakir plazmalar kullanım için hazır hale gelmiştir (**Şekil 20 ve Şekil 21**). Kontrol grubunda kullanılmak üzere 5cc serum fizyolojik aynı hızda ve süre boyunca santrifüj edilmiştir ve kontrol grubunda kullanılmak üzere ayrılmıştır.



Şekil 19:Santrifüj için Centronic-BL P SELECTA® modeli cihaz kullanılmıştır.



Şekil 20: Birinci santrifüj sonrası kanın şekilli elemanlarının ve plazmanın ayrılması (A). Üstteki plazmanın yeni tüpe aktarılması (B).



Şekil 21: İkinci santrifüj sonrası trombositten fakir plazmanın eldesi (A). Tüpün tabanında eritrosit trombosit yığı görülmekte (B).

3.6 DENEY İÇİN GEREKLİ ARAÇ GEREÇLER

Botulinum A Toksini için 100 U BOTOX® (Allergan Pharmaceuticals Inc, Irvine, CA), Trombositten Fakir Plazma hazırlamak için 12 adet sitratlı tüp, tüplere konan kanın santrifüjü için Centronic-BL P SELECTA®santrifüj cihazı, %0.1'lik albumin çözeltisi hazırlamak için bir adet hazır tavşan albumini (Kat no: A0764 SIGMA ALDRICH® St. Louis, Missouri, ABD) ve 1000cc serum fizyolojik solüsyonu kullanılmıştır. Elektronöromyografi çalışması VIA SYS - SYNERGY 12.3 MEDELEC® cihazı ve 3 adet iğne uçlu elektrot kullanılmıştır.

3.7 DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

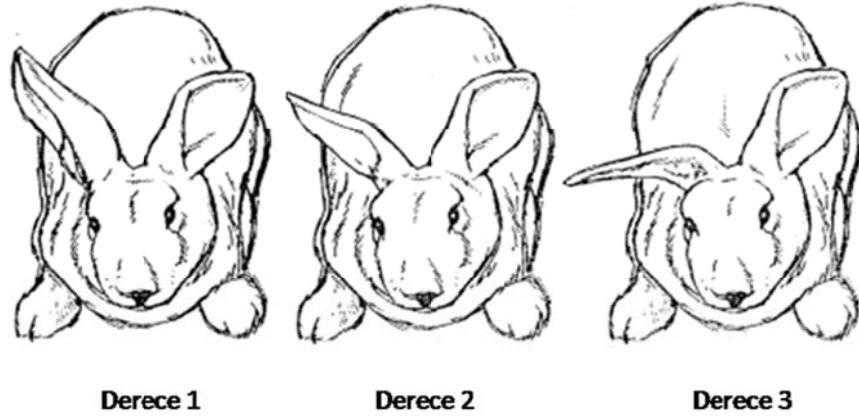
3.7.1 GÖRSEL DEĞERLENDİRME VE FOTOĞRAFİK KAYIT

Botulinum A Toksininin kaslardaki paralitik etkisi nedeniyle kulaklardaki düşme derecesi değerlendirildi. Tüm hayvanların kulakları deneyin 0. günü sağlıklı ve dik konumdaydı. Enjeksiyon sonrası deneyin 14. gününde her hayvanın sol kulağı kontrol taraf kabul edilerek sağ kulağın sol kulağa göre konumu kör çalışan bir araştırmacı tarafından değerlendirildi ve görsel skora yapıldı. Aynı skora, 6. haftada ve toksinin etkisinin geçmesi beklenen süre olan 12. haftada tekrarlandı.(Şekil 22). 3 dereceli skora sisteminde:

Derece 1: Enjeksiyon öncesi pozisyon (Kulak tamamen dik ve karşı kulakla simetrik pozisyonda)

Derece 2: Minimal/Orta derecede paralizi (Kulak 60°'den fazla kaldırılabilir fakat tam dik pozisyon veya karşı kulakla simetri sağlanamaz)

Derece 3: Orta/Ağır derecede paralizi (Paralitık kulak 60°'den fazla kaldırılamaz)



Şekil 22: Kulak pozisyonlarının görsel derecelendirme sistemi ile değerlendirilmesi (Jabor MA, et al., Efficacy of Reconstituted and Stored Botulinum Toxin Type A: An Electrophysiologic and Visual Study in the Auricular Muscle of the Rabbit. Plast Reconstr Surg. 2003;111(7):2419-26'dan modifiye edilmiştir.)

Görsel değerlendirme skalası 2003 senesinde Jabor ve arkadaşlarının yapmış olduğu taze ve bekletilmiş botulinum toksininin etkinliğini değerlendiren çalışma referans alınarak hazırlanmıştır.⁷⁸ Bu çalışmada sol kulak kontrol kulak olarak değerlendirilmiş ve herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Sağ kulaktaki düşüş miktarı sola göre değerlendirilmiştir. Bizim çalışmamızda da tüm tavşanların sağ kulağına enjeksiyon yapılmış ve sol kulakları kontrol kulak olarak bırakılmıştır. Kontrol grubundaki tavşanların sağ kulağına serum fizyolojik enjekte edildiği için bu grupta görsel olarak paralizi açısından sol kulağa göre herhangi bir değişiklik saptanmamıştır (Derece 1).

Görsel skalada değerlendirilen parametreler;

- 1) Her bir grubun görsel skala skorlarının haftalara göre değişimi
- 2) Haftalara göre görsel skala skorlarının gruplar arasında karşılaştırması

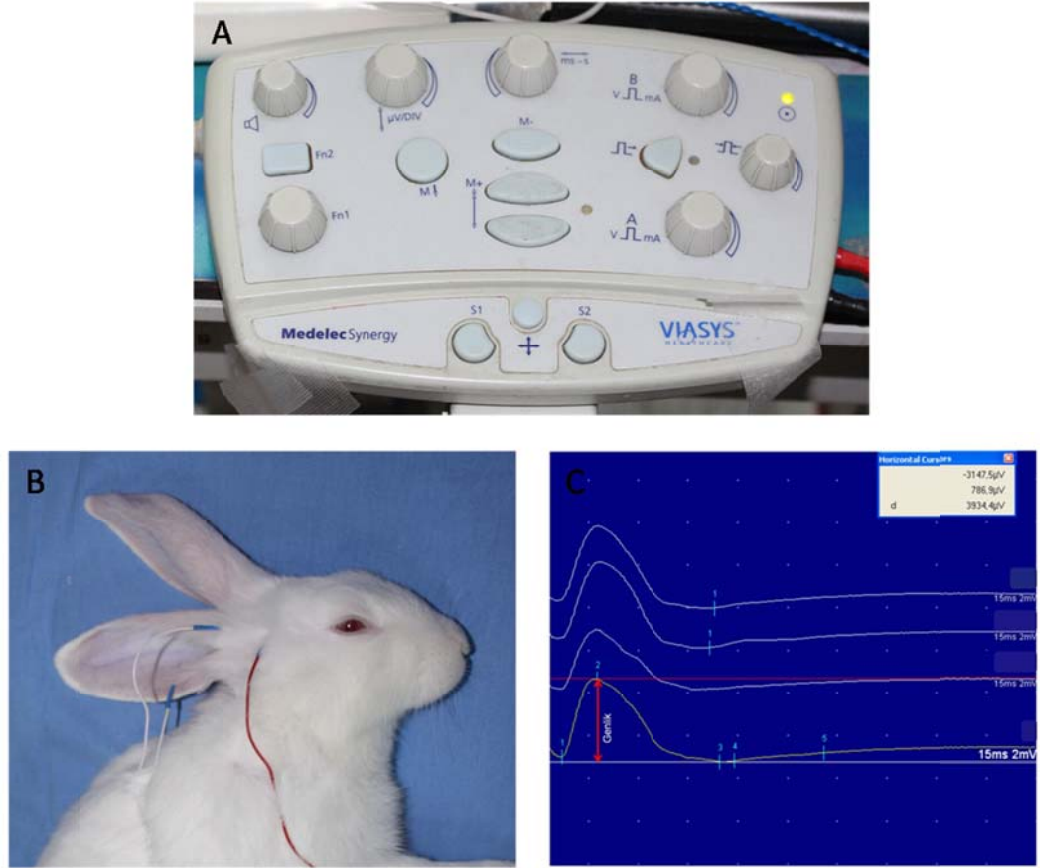
3.7.2 ELEKTRONÖROMYOGRAFİ (ENMG)

Anestezi altında tüm tavşanların sağ kulaktaki anterior aurikuler kas kütlelerinin ortası işaretlendi. Fasiyal sinir trasesi ve uyarı verilecek alan işaretlendi. Kaydedici aktif kayıt elektrodu anterior aurikuler kas orta noktasına (kas göbeğine), referans elektrot anterior aurikuler kasın insersiyosuna batırıldı, toprak iğne elektrot kulağın posterolateraline yerleştirildi. VIA SYS - SYNERGY 12.3 MEDELEC® cihazı kullanılarak mandibula angulus hizasında fasiyal sinirin supramaksimal uyarımı yapılarak elde edilen birleşik kas aksiyon potansiyellerinin (BKAP) amplitüdləri tepeden tepeye ölçüm yöntemi esas alınarak ölçüldü. Her ölçüm 4 kere tekrarlandı ve bunların ortalama değeri kaydedildi (**Şekil 23**). Elektrot noktaları uygulama öncesi (0. gün) yapılan ölçümlerden sonra işaretlendi ve daha sonrasında 2. hafta, 6. hafta ve 12. hafta ENMG uygulamalarında aynı noktalar ölçüm için tekrar kullanıldı. ENMG ile her grupta 0. hafta, 2. hafta, 6. hafta ve 12. haftalardaki aksiyon potansiyellerindeki genlik ayrı ayrı hesaplandı.

ENMG sonucu aşağıdaki parametreler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

- 1) Dört grubun bir arada değerlendirildiği haftalara göre aksiyon potansiyeli değişimi

- 2) Gruplar arası karşılaştırmalı haftalara göre aksiyon potansiyellerindeki değişim
- 3) Her grubun tanımlayıcı istatistiksel değerlendirmesi (Minimum, Maksimum, Mean, SD)
- 4) Grup içi haftalara göre tekrarlı ölçümlerde aksiyon potansiyelleri arasındaki fark



Şekil 23: Elektronöromyografi. VIA SYS - SYNERGY 12.3 MEDELEC® cihazı (A). Kaydedici aktif kayıt elektrotu anterior auricular kas orta noktasına (kas göbeğine), referans elektrotun anterior auricular kasın insersiyosuna batırılması ve toprak iğne elektrotun kulak posterolateraline yerleştirilmesi (B). Birleşik kas aksiyon potansiyellerinin tepe amplitüdlerinin ölçümü ile genlik hesaplanması. Her ölçüm 4 kez tekrarlandı ve bunların ortalama değerleri kaydedildi (C).

3.8 VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZ YÖNTEMLERİ

Verilerin analizi IBM SPSS Statistics 17.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) paket programında yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile varyansların homojenliği ise Levene testiyle araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler medyan (minimum - maksimum) şeklinde gösterildi.

Gruplar arasında medyan amplitüd ve görsel skala dağılımı yönünden farkın önemliliği Kruskal Wallis testleriyle araştırıldı. Kruskal Wallis test istatistiği sonuçlarının önemli bulunduğu durumlarda Conover'in parametrik olmayan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durum(lar) tespit edildi. Tüm denekler içerisinde izlem zamanları arasında medyan amplitüd düzeyleri yönünden farkın önemliliği ise Friedman testiyle incelendi. Gerek Friedman test istatistiği sonucunun önemli bulunması halinde farka neden olan izlem zaman(lar)ını tespit etmek amacıyla gerekse gruplar içerisinde herhangi iki izlem zamanı arasında medyan amplitüd ve görsel skala dağılımı yönünden farkın önemliliğini kıyaslarken Wilcoxon İşaret testi kullanıldı.

Aksi belirtilmedikçe $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

Çalışma öncesi deneklerin karantina süresi boyunca kaybedilen denek olmadı. Deney süresince anesteziye bağlı olarak her bir gruptan birer adet denek kaybedildi. Deneklerin hepsi deneyin sonlandığı 12. haftada yapılan son ENMG' den hemen sonra kaybedildiği için değerlendirme parametrelerinde herhangi bir değişikliğe yol açmadı. Bunun dışında kan alma ve ENMG uygulamaları sırasında herhangi bir komplikasyonla karşılaşılmadı.

4.2 GÖRSEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

Botulinum Toksin uygulaması öncesi tüm deneklerin kulakları aynı pozisyonda dik ve sağlıklıydı. Uygulama sonrası 2. hafta, 6. hafta ve 12. haftada kör bir araştırmacı tarafından kulakların birbirine göre konumunun değerlendirildiği görsel skala skorları ile sonuçlar analiz edildi(**Tablo 6**).

Kulağın enjeksiyon öncesi tam dik pozisyonda olması derece 1 olarak skorlandı. Kulağın 60°' den fazla kalktığı ancak karşı kulakla kıyaslandığında tam olarak dik konumlanamadığı pozisyon derece 2, kulağın 60°'den daha az kaldırılabilirdiği pozisyon derece 3 olarak skorlandı (**Şekil 24, 25, 26**).

Tablo 6: Her bir grubun haftalara göre görsel değerlendirme sonuçları

Gruplar	Denekler	0. hafta	2. hafta	6. hafta	12. hafta
Grup 1	N1	1	2	2	1
	N2	1	2	2	1
	N3	1	3	2	2
	N4	1	3	3	1
	N5	1	2	2	1
	N6	1	2	2	1
Grup 2	N1	1	3	1	1
	N2	1	2	1	1
	N3	1	2	1	1
	N4	1	3	2	1
	N5	1	3	2	1
	N6	1	3	3	1
Grup 3	N1	1	2	1	1
	N2	1	3	2	1
	N3	1	3	3	1
	N4	1	2	1	1
	N5	1	2	1	1
	N6	1	2	2	1
Grup 4	N1	1	1	1	1
	N2	1	1	1	1
	N3	1	1	1	1
	N4	1	1	1	1
	N5	1	1	1	1
	N6	1	1	1	1



Şekil 24: Görsel değerlendirme örneği. Derece 1 kulak pozisyonu (Grup 4-N1).



Şekil 25: Görsel değerlendirme örneği. Derece 2 kulak pozisyonu (Grup 1-N1).



Şekil 26: Görsel değerlendirme örneği. Derece 3 kulak pozisyonu (Grup 2-N1).

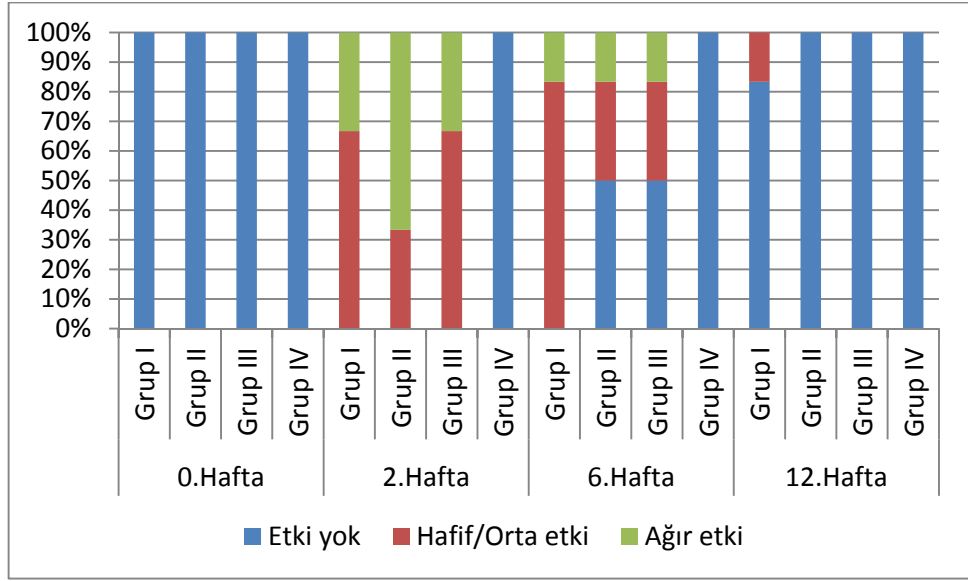
0.Hafta içerisinde gruplar arasında görsel skala dağılımı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p=1,000$).

2.Hafta içerisinde gruplar arasında görsel skala dağılımı yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup Grup I, II ve III' e göre Grup IV' ün istatistiksel anlamlı olarak daha az etkilendiği görüldü ($p<0,001$; $p<0,001$ ve $p<0,001$). Grup I ile II ve Grup II ve III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$ ve $p=0.019$). Grup I ile III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0.05$).

6.Hafta içerisinde gruplar arasında görsel skala dağılımı yönünden Grup I, II ve Grup III' e göre Grup IV' ün istatistiksel anlamlı olarak daha az etkilendiği görüldü ($p<0,001$; $p<0,001$ ve $p<0,001$).Grup I ile Grup II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$), Grup I ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$). Grup II ile III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0.05$).

12.Hafta içerisinde gruplar arasında görsel skala dağılımı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi ($p>0.05$).

Şekil 27'de ve Tablo 7'de gruplara ve izlem zamanlarına göre görsel skala açısından deneklerin dağılımı detaylı gösterilmiştir.



Şekil 27: Gruplara ve izlem zamanlarına göre görsel skala açısından deneklerin dağılımı

Tablo 7: İzlem zamanlarına göre gruplar arası görsel skala açısından değişimin istatistiksel analizi

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	p-değeri †
0.Hafta					1,000
Etki yok	6 (%100,0)	6 (%100,0)	6 (%100,0)	6 (%100,0)	
Hafif/Orta etki	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
Ağır etki	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
2.Hafta					<0,001
Etki yok	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	6 (%100,0) ^{a,b,c}	
Hafif/Orta etki	4 (%66,7) ^{a,d}	2 (%33,3)	4 (%66,7) ^{c,e}	0 (%0,0)	
Ağır etki	2 (%33,3)	4 (%66,7) ^{b,d,e}	2 (%33,3)	0 (%0,0)	
6.Hafta					0,021
Etki yok	0 (%0,0)	3 (%50,0) ^{b,d}	3 (%50,0) ^{c,f}	6 (%100,0) ^{a,b,c}	
Hafif/Orta etki	5 (%83,3) ^{a,d,f}	2 (%33,3)	2 (%33,3)	0 (%0,0)	
Ağır etki	1 (%16,7)	1 (%16,7)	1 (%16,7)	0 (%0,0)	
12.Hafta					0,392
Etki yok	5 (%83,3)	6 (%100,0)	6 (%100,0)	6 (%100,0)	
Hafif/Orta etki	1 (%16,7)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	
Ağır etki	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	0 (%0,0)	

† Kruskal Wallis testi, a: Grup I ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), b: Grup II ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), c: Grup III ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), d: Grup I ile Grup II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$), e: Grup II ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,019$), f: Grup I ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$).

Grup I içerisinde izlem zamanları birbirleri arasında ikili kıyaslandığında 0. hafta-2. hafta, 0. hafta-6. hafta, 2. hafta-12. hafta ve 6. hafta-12. hafta arasında görsel skala dağılımı yönünden farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).2. hafta ve 6. hafta arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Grup II içerisinde izlem zamanları birbirleri arasında ikili kıyaslandığında 0. hafta-2. hafta, 2. hafta-6. hafta ve 2. hafta-12. hafta arasındaki görsel skala dağılımı yönünden farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).Özellikle 0. hafta-6. hafta arasındaki fark anlamsız olarak saptanmıştır.

Grup III içerisinde izlem zamanları birbirleri ile ikili kıyaslandığında 0. hafta-2. hafta, 2. hafta-6. hafta ve 2. hafta-12. hafta arasındaki görsel skala dağılımı yönünden farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).0. hafta-6. hafta arasındaki fark anlamsız olarak saptanmıştır.

Grup IV içerisinde izlem zamanları birbirleri arasında ikili kıyaslandığında görsel skala dağılımı yönünden anlamlı farklılık görülmedi. ($p>0.05$).

Grupların kendi içinde haftalara göre görsel skala analizi **Tablo 8**'de yer almaktadır.

Tablo 8. Her bir grup içerisinde izlem zamanları arasında görsel skala açısından yapılan çoklu karşılaştırma sonuçları (Wilcoxon işaret testi).

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
0.Hafta vs 2.Hafta	p=0,023	p=0,023	p=0,023	p=1,000
0.Hafta vs 6.Hafta	p=0,020	p=0,102	p=0,102	p=1,000
0.Hafta vs 12.Hafta	p=0,317	p=1,000	p=1,000	p=1,000
2.Hafta vs 6.Hafta	p=0,317	p=0,034	p=0,046	p=1,000
2.Hafta vs 12.Hafta	p=0,020	p=0,023	p=0,023	p=1,000
6.Hafta vs 12.Hafta	p=0,034	p=0,102	p=0,102	p=1,000

4.3 ELEKTRONÖROMYOGRAFİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Aksiyon Potansiyeli Amplitüdü Değerlendirme Bulguları

Uygulamadan önce (0. hafta-G1) ve toksin uygulaması sonrası 2. hafta (G2), 6. hafta (G3) ve 12. haftada (G4) yapılan elektronöromyografi çalışmalarında elde edilen kas aksiyon potansiyelleri amplitüd ölçümleri (μV) değerlendirildi. Bu ölçümlere göre deneklerin kas aksiyon potansiyelleri amplitüd ölçümleri (μV) **Tablo 9'**da görülmektedir.

Tüm denekler içerisinde en az iki izlem zamanı arasında medyan amplitüd düzeyleri yönünden istatistiksel anlamlı fark görüldü ($p<0.001$) (**Tablo 10 ve Şekil 28**). 0. haftaya göre 2. ve 6. hafta amplitüd düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.001$ ve $p<0.001$). 0. hafta ve 12. hafta arasında medyan amplitüd düzeyleri istatistiksel olarak benzer bulundu ($p=0.009$). 2. haftaya göre sırasıyla 6. ve 12. hafta amplitüd düzeyi istatistiksel anlamlı daha yüksekti ($p<0.001$ ve $p<0.001$). Ayrıca 6. haftaya göre 12. hafta amplitüd düzeyi de istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.001$).

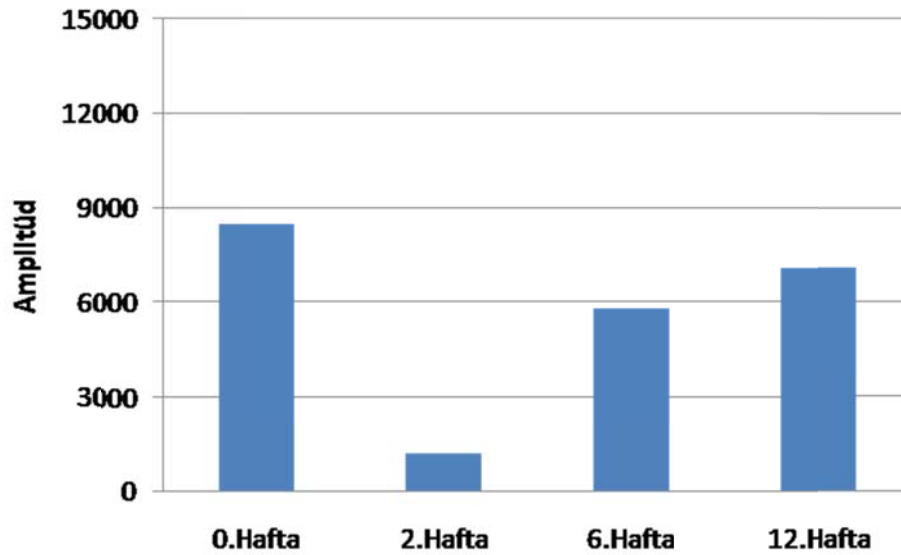
Tablo 9: Deneklerin sağ kulak kas aksiyon potansiyellerinin haftalara göre değişimi (μV).

Gruplar	Denekler	G1 (0. hafta)	G2 (2. hafta)	G3 (6. hafta)	G4 (12. hafta)
Grup 1	N1	7890	2229	1434	4572
	N2	8796	1196	1085	4803
	N3	9808	901	1802	4875
	N4	9765	789	879	7131
	N5	8574	2278	4754	8686
	N6	7372	1232	1990	6013
Grup 2	N1	6803	688	5869	6504
	N2	8196	868	7528	7118
	N3	7868	2721	7623	7025
	N4	15328	360	4393	9587
	N5	12295	1311	9180	12458
	N6	12951	819	2770	12475
Grup 3	N1	5573	623	5487	5478
	N2	10820	750	3524	3967
	N3	14590	2491	3524	10098
	N4	5981	1098	5816	6121
	N5	6967	1000	5819	7384
	N6	14672	1180	9918	11258
Grup 4	N1	8392	7997	8428	7818
	N2	7562	7377	8426	8688
	N3	12046	11300	12806	14587
	N4	5500	5901	6200	5003
	N5	10426	10164	12000	12524
	N6	6425	5245	5800	5852

Tablo 10. Tüm denekler içinde izlem zamanlarına göre EMG' de saptanan amplitüd ölçümleri

	n	Amplitüd
0.Hafta	24	8483 (5500-15328) ^{a,b}
2.Hafta	24	1214 (360-11300) ^{a,c,d}
6.Hafta	24	5808 (879-12806) ^{b,c,e}
12.Hafta	24	7124,5 (3967-14587) ^{d,e}
p-değeri †		<0,001

† Friedman testi, a: 0.hafta ile 2.hafta arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), b: 0.hafta ile 6.hafta arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), c: 2.hafta ile 6.hafta arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), d: 2.hafta ile 12.hafta arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), e: 6.hafta ile 12.hafta arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$).



Şekil 28: Tüm deneklerin izlem zamanlarına göre aksiyon potansiyel amplitüdüleri

0. hafta içerisinde gruplar arasında medyan amplitüd düzeyleri yönünden istatistiksel anlamlı fark görülmedi ($p=0.704$).

2. hafta içerisinde gruplar arasında medyan amplitüd düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup Grup I,II ve III' e göre Grup IV' ün amplitüd düzeyi istatistiksel olarak anlamlı daha yüksekti ($p<0.001$; $p<0.001$ ve $p<0.001$). Ayrıca, Grup I' e göre Grup II'

nin medyan amplitüd düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü ($p=0.010$). Grup I ve III arasında ve Grup II ve III arasında istatistiksel anlamlı olarak fark yoktu ($p=0.035$ ve $p=0.578$).

6. hafta içerisinde gruplar arasında medyan amplitüd düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark olup Grup I, II ve III' e göre Grup IV' ün amplitüd düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.001$; $p<0.001$ ve $p<0.001$). Ayrıca Grup I' e göre sırasıyla Grup II ve Grup III' ün medyan amplitüd düzeyi istatistiksel anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0.001$ ve $p<0.001$). Grup II ile III arasında ise istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p=0.136$).

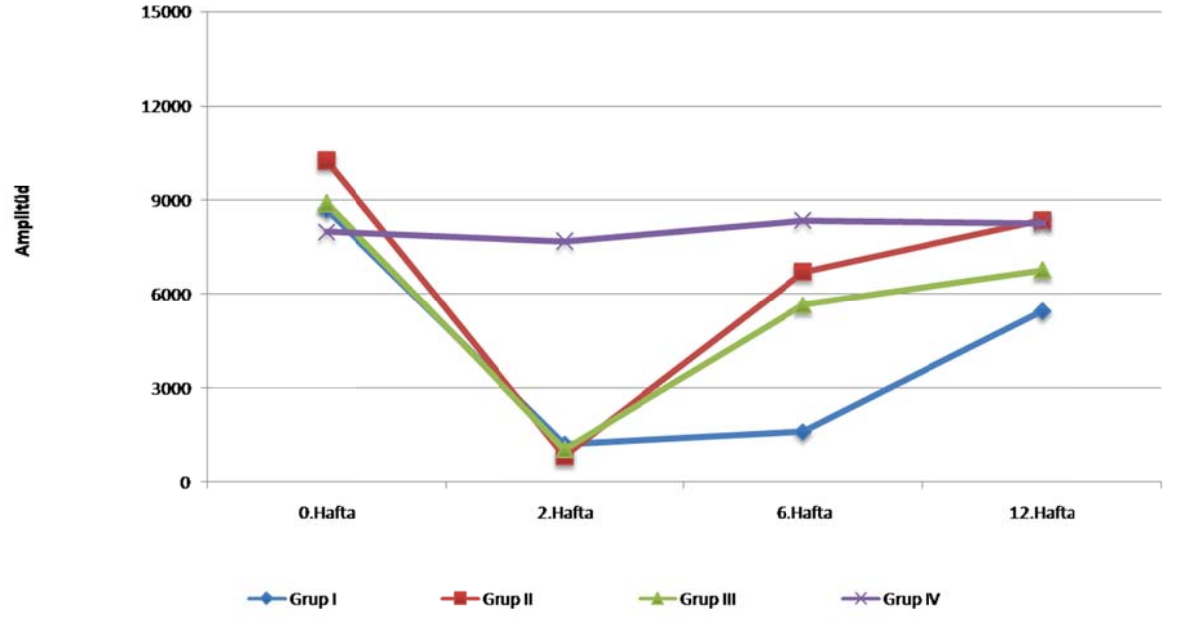
12. hafta içerisinde gruplar arasında medyan amplitüd düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0.173$).

Tablo 11 ve **Şekil 29** ve **30**'da gruplara ve izlem zamanlarına göre ENMG' de saptanan amplitüd ölçümlerinin dağılımı gösterilmiştir.

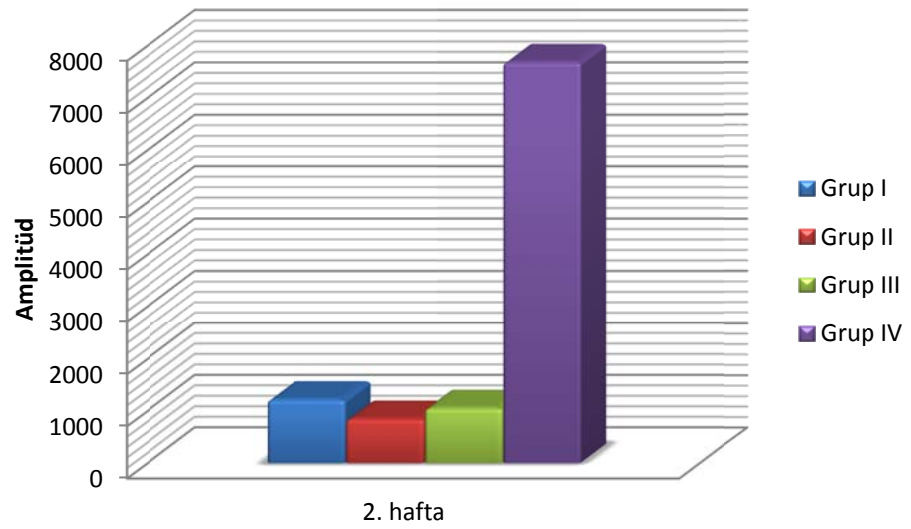
Tablo 11. Gruplara ve izlem zamanlarına göre EMG' de saptanan amplitüd ölçümleri.

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV	p-değeri †
0.Hafta	8685 (7372-9808)	10245,5 (6803-15328)	8893,5 (5573-14672)	7977 (5500-12046)	0,704
2.Hafta	1214 (789-2278) ^{a,d}	843,5 (360-2721) ^{b,d}	1049 (623-2491) ^c	7687 (5245-11300) ^{a,b,c}	0,003
6.Hafta	1618 (879-4754) ^{a,d,e}	6698,5 (2770-9180) ^{b,d}	5651,5 (3524-9918) ^{c,e}	8337 (5800-12806) ^{a,b,c}	0,003
12.Hafta	5444 (4572-8686)	8352,5 (6504-12475)	6752,5 (3967-11258)	8253 (5003-14587)	0,173

† Kruskal Wallis testi, a: Grup I ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), b: Grup II ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), c: Grup III ile Grup IV arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$), d: Grup I ile Grup II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,01$), e: Grup I ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,05$).



Şekil 29: Grupların medyan amplitüd değerlerinin ENMG' de izlem zamanlarına göre değişimi



Şekil 30: 2. hafta medyan amplitüd değerlerinin gruplara göre dağılımı

Grup I içerisinde izlem zamanları birbirleri arasında ikili kıyaslandığında medyan ENMG düzeylerinde 0. hafta-2. hafta, 0. hafta-6. hafta, 0. hafta-12. hafta, 2. hafta-12. hafta ve 6. hafta-12. hafta arasında istatistiksel olarak fark anlamlı bulunmuştur. 2. hafta ve 6. hafta arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamsız bulunmuştur

Grup II içerisinde izlem zamanları birbirleri arasında ikili kıyaslandığında medyan ENMG düzeylerinde 0.hafta-2. hafta, 0.hafta-6. hafta, 2. hafta-6. hafta ve 2. hafta-12. hafta arasındaki istatistiksel fark anlamlı bulunmuştur. 6. hafta ve 12. hafta arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.

Grup III içerisinde izlem zamanları birbirleri arasında ikili kıyaslandığında medyan ENMG düzeylerinde 0. hafta-2. hafta, 0. hafta-6.hafta, 2.hafta-6. hafta, 2. hafta-12. hafta arasındaki istatistiksel fark anlamlı bulunurken, 6. hafta ve 12. hafta arasındaki fark anlamsız bulunmuştur.

Grup IV içerisinde izlem zamanları birbirleri ile ikili kıyaslandığında medyan ENMG düzeyleri yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p>0.05$) **(Tablo 12).**

Tablo 12. Her bir grup içerisinde izlem zamanları arasında EMG' de saptanan amplitüd ölçümleri yönünden çoklu karşılaştırma sonuçları (Wilcoxon işaret testi).

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
0.Hafta vs 2.Hafta	p=0,028	p=0,028	p=0,028	p=0,173
0.Hafta vs 6.Hafta	p=0,028	p=0,028	p=0,028	p=0,075
0.Hafta vs 12.Hafta	p=0,046	p=0,080	p=0,249	p=0,345
2.Hafta vs 6.Hafta	p=0,345	p=0,028	p=0,028	p=0,080
2.Hafta vs 12.Hafta	p=0,028	p=0,028	p=0,028	p=0,173
6.Hafta vs 12.Hafta	p=0,028	p=0,116	p=0,116	p=0,753

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

19. yüzyılın sonunda besin zehirlenmeleri sonrasında meydana gelen paraliziler sonucunda keşfedilen toksin günümüzde çeşitli nöromusküler hastalıklardan kozmetik amaçlı kırışıklıkların giderilmesine kadar geniş bir spektrumda kullanıma girmiştir. Şu ana kadar toksin uygulamasına bağlı hayati risk oluşturan ciddi yan etkiler bildirilmese de, toksinin yaratacağı istenmeyen yan etkilerin tedavisi güç olabilmektedir. Bu amaçla literatürde toksinin etkinliğini azaltmaya yönelik yapılmış birçok çalışma ve tanımlanmış bir takım kimyasal maddeler mevcuttur.^{53,83} Ancak toksinin etkinliğini veya biyoyararlanımını arttırmaya yönelik yapılmış çalışmalar veya tanımlanmış kimyasal maddeler sınırlı sayıdadır.

1992 yılında Goodnough ve ark. yapmış olduğu çalışmada belli konsantrasyondaki sığır ve/veya insan serum albumininin liyofilizasyon sonrası

toksin etkinliğinin %90'dan fazla geri kazanılmasında etkili olduklarını göstermiştir.⁸⁴

2006 yılında Mc Allister ve ark. toksin hafif zincir metalloproteaz bölgesindeki domaine non spesifik olarak bağlanıp toksin aktivitesini arttıran 2-acyl guanidyl-5-phenyl thiophene isimli maddeyi tanımlamışlardır.⁷⁰

2001 yılında Bigalke ve ark. Dysport®'ta biyoyararlanımın artırılması için düşük konsantrasyonda enjeksiyon, toksine ekstra albumin ilavesi veya enjeksiyon volümlerinin artırılmasının gerekli olduğundan bahsedilmiştir.¹⁴ Plastik cerrahi literatüründe ve alanında bu tür uygulamalara rastlanılmaması ve diğer alanlarda yapılmış çalışmaların az sayıda olması bizim bu çalışmayı planlamamızda etkili olmuştur. Nöroloji alanında yapılmış biyoyararlanımı artırma çalışmalarında bu modifikasyonun plastik cerrahi alanına uyarlanıp uyarlanamayacağına yönelik bir yorum veya netlik söz konusu değildir. Bizim deneysel modelimiz klinik olarak hastalarda kozmetik amaçlı toksin uygulamaları baz alınarak oluşturulmuştur.

Deney modeli olarak Jabor ve arkadaşlarının 2003 yılında tanımlamış oldukları tavşan anterior aurikuler kas modeli seçildi.⁷⁸ Bu modelde tavşan anterior aurikuler kasında paralizi yapan minimum etkin toksin dozu belirlenmiştir ve toksin olarak BOTOX® kullanılmıştır.

Aynı model 2006 yılında Görgü ve ark. tarafından lokal anestetiklerle botulinum toksin etkileşiminin gösterilmesinde,⁷⁹ 2007 yılında Elmas ve ark. tarafından taze ve bekletilmiş botulinum toksin etkisinin değerlendirilmesinde,⁷¹ 2013 yılında Bulam ve ark. tarafından TZP' nin botulinum toksin ile etkileşiminin

değerlendirilmesinde kullanılmıştır.¹⁵ Bu çalışmaların hepsinde Botox® kullanılması ve güvenli etkin doz aralığının bilinmesi bizimde aynı ticari formu seçmemizde etkili olmuştur. Tavşan modeli hem kulak pozisyonundaki değişimlerin gözlenmesine ve görsel skala ile değerlendirilmesine hem de elektronöromyografik incelemeye olanak sağlamaktadır. Ayrıca deneklerden yaklaşık 2cc otolog TFP elde edecek kadar kan alınabilmesi ve sonrasında hayvanın güvenli bir şekilde yaşatılabilmesi için gerekli en küçük denek modelinin tavşan olması tavşan modelini seçmemizde etkili olmuştur.

Deney grupları, plastik cerrahide klinik toksin uygulamaları örnek alınarak ve toksinin etkisini arttırabileceği düşünülen maddelerin klinik duruma birebir olarak kolayca uyarlanabileceği şekilde tasarlanmıştır.

Grup I birinci çalışma grubu olup toksin standart klinik uygulamalardaki gibi serum fizyolojik ile sulandırılarak hazırlanmıştır ve bizim klinikteki toksin uyguladığımız hasta popülasyonunun deneysel modelini temsil etmektedir.

Grup II ise ikinci çalışma grubu olup, toksinin sulandırılmasında %0.1'lik hazır tavşan albumini kullanılmıştır. Bu grup daha önceden yapılmış olan biyoyararlanım çalışmaları referans olarak oluşturulmuştur ve klinik uygulamada toksinin hazır insan serum albumini ile sulandırılarak hazırlanmasını temsil etmektedir. Ancak bu uyarlama her hasta için toksinin hazır insan albumini ile sulandırılarak hazırlanması, yüksek maliyetli olması, pratik uygulamadaki zorluklar ve düşüğe olsa kan ürünleri ile bulaşan viral hastalık transmisyon riskinden ötürü klinik uygulamaya pek uygun değildir. Maliyet sorununun önüne geçmek, nispeten kolay uygulanabilir olması ve hastalık geçiş riskini önlemek için

insanların kendi albumini toksin biyoyararlanmasını arttırmada her bireye özgü olarak kullanılabilir. İnsanlardan saf albumin eldesi zaman alan ve yüksek maliyetli olan bir işlem olduğu için pratik yoldan minimum maliyetle albuminden zengin bir madde elde etmenin en kolay yolu kanın santrifüjle plazma ve şekilli elemanlara ayrılması ile olur. Plazmanın içinde yüksek oranda albumin ve daha az oranda da kandaki diğer proteinler bulunmaktadır. Kliniğimizde Bulam ve ark. tarafından yapılmış çalışmada TZP' nin toksinin çizgili kas paralizisi üzerinde olumsuz etkisinin olduğu gösterilmiştir.¹⁵ Bu nedenle TFP kullanılarak toksinin sulandırılması planlandı ve bu amaçla Grup III üçüncü çalışma grubu oluşturuldu.

Grup III bizim klinik uygulamalarımızda her hastada albuminden zengin TFP eldesi ile toksin enjeksiyonu modelini temsil etmektedir. Grup IV kontrol grubu olup, Grup I-II ve III' ün kontrolü olarak tasarlandı. Bu modelin kullanıldığı çalışmalarda hem aynı denekte kulakların birbirine göre pozisyonu ve ölçüm değerleri, hem de gruplar arasındaki genel farklar önem arz etmektedir. Ayrıca botulinum toksin uygulamalarının özünde çoklu intramuskuler veya subkutan uygulamalar söz konusu olduğundan enjeksiyonda el becerisi önem arz etmektedir. Tavşan derisi insan cildinden farklı olup enjeksiyon öncesi uygulama için kas anatomisinin ortaya konması ve enjeksiyon pratiği yapılması önemlidir.

Elektromyografik (ENMG) çalışmalarda çalışmanın yapıldığı noktalar 0. haftadaki bazal ENMG' den hemen sonra işaretlenmiş ve 2. hafta, 6. hafta ve 12. haftalarda tekrarlanan ölçümler için hep bu nokta kullanılmıştır çünkü farklı noktalardan yapılacak ölçümler sonuçları değiştirecektir. Çalışmamızda Jabor ve arkadaşlarının tanımlamış olduğu model baz alınarak ve öncesinde yapmış

olduğumuz pilot çalışmada kasın anatomisi göz önünde bulundurarak tavşan anterior aurikuler kasın orta kısmında maksimum elektriksel aktivitenin elde edildiği nokta işaretlenerek aksiyon potansiyellerinin ölçümü öncesinde ve sonrasında bu noktalardan yapılmıştır.

Değerlendirme görsel ve elektrofizyolojik olarak 2 şekilde yapılmıştır. Görsel değerlendirmede kulak pozisyon değişimleri izlem zamanlarına göre grup içi ve gruplar arasında karşılaştırılmıştır. ENMG' de ise izlem zamanlarına göre grup içi ve gruplar arası kas aksiyon potansiyelleri arasındaki farklar değerlendirilmiştir. Uygulamalar öncesi (0. hafta) yapılan görsel değerlendirmelerde deneklerin hiçbirinde kulak pozisyonlarında fark görülmedi ve hepsi dik pozisyondaydı. Deneklerin temin edilmesi sırasında kulaklarında herhangi bir patolojik durum olmamasına dikkat edilmişti ve kulak pozisyonları ile ilgili bir farklılık gelişmedi.

Görsel skalada grup içi bulgular incelendiğinde;

Grup I' de görsel skalada 0. hafta ve 6. hafta arasındaki farkın anlamlı olması toksinin etkisinin 6. haftada devam edebileceği şeklinde yorumlandı. 6. hafta ve 12. hafta arasındaki skor farkının anlamlı olması ve 0. hafta ile 12. hafta arasındaki skor farkının anlamsız olması toksinin etkisinin 12. haftada sonlandığını göstermekteydi.

Grup II' de görsel skalada 0. hafta ve 2. hafta arasındaki farkın anlamlı olması toksinin etkisinin 2. haftada istenen düzeyde olduğunu göstermekteydi. Ancak 2. hafta ve 6. hafta skorlarının 2. hafta lehine anlamlı yüksek olması ve 0. hafta ile 6. hafta arasındaki görsel skor farkının anlamsız olması toksinin etkisinin 6. haftada

istenen düzeyde olmadığı şeklinde yorumlandı ve bu sonuçların ENMG bulguları ile de değerlendirilmesi daha net bir yorum yapmamızı sağlayacağı düşünüldü.

Grup III' ün kendi içinde izlem zamanına göre olan görsel skala bulguları Grup II' nin kendi içindeki bulgularla benzer olarak bulundu, olası nedenlerin ENMG bulguları ile korelasyonunun araştırılması planlandı.

Grup IV kontrol grubu olduğu için haftalara göre görsel skorda herhangi bir değişimin olmaması beklenen bir bulguydu.

Görsel skalada gruplar arası bulgular incelendiğinde;

2. haftada Grup I, II ve III' ün, Grup IV' e göre skorları anlamlı daha yüksekti. Toksinin tüm çalışma gruplarında kontrol grubuna göre etkin bir paralizi yarattığı görüldü. Grup II' nin Grup I ve III' e göre görsel skorları anlamlı daha yüksekti ve ağır paralizili denek sayısı daha fazlaydı. Bu bulguların ENMG bulguları ile korelasyonunun araştırılması planlandı.

6. haftada Grup I, II ve III' ün Grup IV' e göre skorları anlamlı daha yüksek bulundu ancak Grup I' in, Grup II ve III' e göre skorları daha yüksekti. Bu da 6. haftada grup içi değerlendirme bulguları ile örtüşmekteydi. 6. haftada standart sulandırmanın albumin ve/veya TFP ile sulandırmaya göre idame etkide daha başarılı olduğu düşünüldü.

12. haftada sadece Grup I' de bir denekte hafif paralizinin olduğu gözlemlendi ancak tüm çalışma grupları ve kontrol grubunda anlamlı fark yoktu ve deneklerin hepsinde toksinin etkinliğini yitirmiş olduğu düşünüldü.

ENMG' de grup içi bulgular incelendiğinde;

Grup I' de 0. hafta ile 6. hafta arasında anlamlı farkın olması ve 2. hafta ile 6. hafta arasında anlamlı farkın olmaması toksinin 6. haftada dahi etkinliğini devam ettirdiği şeklinde yorumlandı. Bu bulguların görsel skala bulguları ile korele olduğu görüldü.

Grup II' de 0. hafta-2. hafta, 2. hafta-6. hafta ve 0. hafta-6. hafta arasındaki anlamlı fark toksinin 2. haftada etkisinin başladığı ancak 6. haftada 2. haftadaki kadar etkin olmadığı şeklinde yorumlandı. Bu bulgular büyük ölçüde görsel skala bulguları ile örtüşmekteydi.

Grup III' deki bulgularda toksinin etkisinin 2. haftadan 6. haftaya doğru progresif bir şekilde etkinliğini kaybettiği şeklinde yorumlandı ve görsel skala bulguları ile korele idi.

ENMG' de gruplar arası bulgular incelendiğinde;

2. haftada tüm çalışma gruplarının aksiyon potansiyellerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde düşmüş olduğunun gözlenmesi toksinin etkisinin başladığını göstermektedir. Grup II' deki paralizinin Grup I' e göre anlamlı bulunması ve bu bulgunun görsel skala ile örtüşmesi albumine bağlı olarak toksinin ilk haftalarda daha etkili bir paralizi oluşturduğu göstermiştir. Grup II ve III arasında anlamlı fark olmamasına rağmen medyan amplitüdler değerlendirildiğinde Grup II' nin medyan amplitüdlere daha düşük bulunmuştur.

6. haftada tüm çalışma gruplarının aksiyon potansiyelleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olsa da Grup I' in Grup II ve III' e göre yarattığı çizgili kas paralizisinin daha etkin olduğu görüldü. Görsel skala ile de bulgular

örtüşmekteydi. Albumin ve TFP ilavesinin 6. haftada toksin etkisi üzerinde olumsuz bir etki yarattığı görüldü.

12. haftada tüm gruplar arasında fark olmayıp, farklı sulandırma yöntemlerinin ilaç yarılanma ömrüne olumlu bir etkisinin olmadığı aksine ilacın etkin süresini azaltabileceği düşünüldü.

Albuminle toksinin sulandırılması ve biyoyararlanımı arttırmaya yönelik nöroloji literatüründe çalışmalara rastlanmıştır. 2000 yılında Rollnik ve arkadaşlarının yaptığı klinik araştırmada 115 hastalık bir seride Dysport® insan albumini ile sulandırılarak hazırlanmış ve albuminle sulandırmanın ilacın etki süresini uzattığı ve daha düşük dozda aynı terapötik etkinliğe ulaşıldığı saptanmış.¹³ Ancak çalışmada aynı bulguların Botox® için genellenmesinin doğru olmayacağı ve Botox® ile de daha ileri çalışmaların yapılması gerektiğinden bahsedilmiştir. 2001 yılında Bigalke ve arkadaşları insan albumini ile Dysport®'u sulandırıp hem in vivo hem de in vitro çalışma modeli için kullanmışlardır.¹⁴ İn vitro çalışma modelinde fare hemidiyaframı organ banyosunda ENMG ile değerlendirilmiştir. İn vivo modelde insan EDB (Extensor Digitorum Brevis) kasına enjeksiyon yapılmıştır. İn vitro modelde toksinin albumin ilavesi sonrasında paralizi için gereken latent süreyi kısalttığı ve daha etkin bir paralizi oluşturduğu bulunmuştur. Bu bulgunun bizim yaptığımız çalışmanın bulguları ile örtüştüğü görüldü. İn vivo çalışma modelindeki hastalar yüksek ve düşük konsantrasyonda toksin enjeksiyonu şeklinde 2 gruba ayrılmış ancak etki süresini karşılaştırmaya yönelik bu grupların kontrolü olacak standart sulandırma grubu oluşturulmamıştır. 2009 yılında Mohammadi ve arkadaşları servikal distoni,

blefarospazm ve hemifasiyal spazm için 106 hastalık bir grupta insan albumini ile sulandırılmış Dysport® ve/veya Botox® ile standart sulandırmayı karşılaştıran bir çalışma yapmış 2 grup arasında yanıt başlangıç zamanları ve etkinlik süreleri birbirine benzer bulunmuş ancak albumin ilavesi yapılan grupta yan etkilerin daha az rastlanıldığı sonucuna varılmış.⁸¹ Yapılmış olan bu çalışmalarda albumin ilavesinin, toksinin şişe duvarına ve plastik yüzeylere non spesifik adsorbsiyonunun önüne geçtiğinden bahsedilmektedir. Non spesifik adsorbsiyonunun azaltılması dışında, albuminin ilaç için taşıyıcı molekül görevi görmesiyle birlikte ilacın yarılanma ömründeki artış, toksin için stabilizatör görevi görmesi ve motor son plağa daha etkin difüzyonu sağlaması diğer biyoyararlanımı arttırabilecek olası faktörler olarak sayılmıştır. Yine Botox® ve Dysport® arasındaki potens farkının bu iki ürünün içindeki birim toksin ünitesi başına düşen albumin miktarına bağlı olabileceğinden bahsedilmektedir.

Bizim çalışmamızda 2. haftada albumin ile sulandırılmış grubun (Grup II) standart sulandırmaya oranla (Grup I) daha etkin çizgili kas paralizisi yaratmış olduğu görüldü. Ancak 6. haftada aynı etkinin görülmediği tam aksine standart sulandırmanın (Grup I) albumin (Grup II) ve TFP (Grup III) ile sulandırmalara kıyasla çizgili kas paralizisini daha etkin bir şekilde sürdürdüğü gözlemlendi. 6. haftadaki bulgular, daha önceki yapılmış çalışmalar ile tam tersi sonuçlar göstermekteydi.

Grup III' de 6. haftada ortaya çıkan bu ters etkinin TFP' ye bağlı olabileceği düşünüldü. Kliniğimizde 2013 yılında Bulam ve ark. tarafından yapılmış çalışmada TZP' deki trombositlerin granüllerinde bulunan proteazların toksin

aktivitesinde azalma yarattığı tespit edilmiştir.¹⁵ Bizim çalışmamızda TFP kullanılmasına rağmen geride kalan rezidüel trombositlerin ($< 10.000/\mu\text{L}$) toksin üzerinde aynı olumsuz etkiyi yaratmış olabileceği düşünüldü ve plastik cerrahide kozmetik amaçlı toksin uygulamalarında toksinin TFP ile sulandırılmasının sakıncalı olduğu bulundu.

Grup II' de 6. haftada toksinin aktivitesindeki azalmada birden çok faktörün etkili olabileceği düşünüldü.

Albumin başlangıçta daha etkin bir paralizi oluşturulmasında yardımcı olmasına rağmen, ilerleyen dönemlerde motor son plakta aksonal filizlenme üzerine muhtemel bir olumlu etki yaratmış olabilir. Albuminin motor son plakta sinir rejenerasyonu üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığı ile başka araştırmaların yapılması gelecekte planlandı.

Toksinin tavşan serum albumini ile sulandırılmasıyla toksinin içinde birden fazla ve farklı yapıda protein (insan serum albumini ve tavşan serum albumini) bir araya geldiği için toksin üzerinde yeni epitop oluşumuna yol açmış olabilir. Buna bağlı olarak yeni nötralizan antikör oluşumu toksinin etkinliğini azaltmış olabilir.⁸⁵⁻⁸⁶

İnsan ve tavşan serum albumini arasında muhtemel bilinmeyen etkileşimlere bağlı etkinlik kaybı ile karşılaşılmış olunabilir.

Önceki biyoyararlanımı arttırma çalışma modelleri ile bizim deneysel modelimiz arasındaki bir takım farklılıklar sonuçların birbirinden farklı çıkmasında etkili olmuş olabilir. Toksin olarak Dysport®' un tercih edilmesi, kullanılan dozların bizim çalışmamızdaki dozların 10-90 katı olması, albumin ile

sulandırmanın 10 kat daha fazla hacimde yapılması, yüksek hacimli enjeksiyonlar ve Botox® ile ilgili verilerin sınırlı olması bu farklılıklardan birkaçıdır.

Nöromuskuler hastalıklar için yüksek hacimli enjeksiyonlarda albuminin katkısı gösterilmiş olmasına rağmen plastik cerrahide kozmetik amaçlı uygulamalarda düşük hacimli enjeksiyonlar yapılmaktadır ve bu tür sulandırmadaki modifikasyonların kozmetik amaçlı uygulamalar için yapılmasının bizim çalışmamız verileriyle uygun olmadığı kanısına varılmıştır.

Botulinum toksin çalışmaları için tavşan modeli mükemmel bir seçenek olmasına rağmen biyoyararlanım çalışmaları için toksinin hazır insan albumini ile sulandırılarak tavşana verilmesi immünolojik açıdan uygun değildir. Bizim çalışmamızda da bu yüzden tavşan serum albumini kullanılmıştır.

İmmun sistemi baskılanmış farelerde ve daha geniş gruplarda toksinin insan albumini ile sulandırılarak başka biyoyararlanım çalışmalarının gelecekte yapılmasının daha uygun olacağı düşünüldü.

Görsel ve ENMG değerlendirmelerin yanı sıra histolojik ve genetik analiz değerlendirmelerinin eklenmesi gelecekte yapılması planlanan çalışmalarda sonuçların daha kuvvetli korelasyonunu göstermek için faydalı olacaktır.

Sonuç olarak bu çalışma ile botulinum toksininin albumin ve/veya TFP ile sulandırılmasının standart sulandırmaya göre üstünlüğünün olmadığı saptanmış ve plastik cerrahi alanındaki uygulamalar için bu tür modifikasyonların kullanılması uygun bulunmamıştır.

6. ÖZET

Plateletten Fakir Tavşan Plazması ile Sulandırılmış Botulinum A Toksininin biyoyararlanım üzerine etkisi

Otolog kanın santrifüj işlemlerinden geçirilmesiyle elde edilen Trombositten Fakir Plazma (TFP) yüksek oranda albumin içermektedir. Botulinum A Toksini (BTxA) sinir kas kavşağında SNAP-25 proteinini kırarak asetilkolin salınımını engelleyen nörotoksindir.

Çalışmanın amacı BTxA'nın saf albumin ve/veya TFP ile sulandırılmasının toksin biyoyararlanımı üzerine etkisini araştırmaktır.

Çalışmada 24 adet Yeni Zelanda tipi tavşan kullanıldı. Tavşan Anterior Aurikuler kas (AAK) modelinde çalışıldı. Denekler 4 gruba ayrıldı ve sağ kulak AAK içine farklı sulandırma yöntemleri ile hazırlanmış BTxA enjekte edildi. Grup I'deki deneklere 2.5U serum fizyolojik (SF) ile sulandırılmış BTxA, Grup II'deki deneklere saf tavşan albumini ile sulandırılmış BTxA, Grup III'deki deneklere otolog TFP ile sulandırılmış BTxA enjekte edildi. Grup IV ise kontrol grubu olarak tasarlandı ve SF enjekte edildi.

Uygulamalar öncesi deneklerin kulaklarının fotografik kaydı ve elektronöromyografik (ENMG) incelemesi yapıldı ardından tüm gruplarda enjeksiyonlar gerçekleştirildi. Uygulamalar sonrası 2, 6 ve 12. haftalarda görsel ve ENMG değerlendirmeleri tekrarlandı.

2. haftada Grup II'de medyan amplitüd düzeylerinde diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı düşüş saptandı.

6. haftada Grup I'de medyan amplitüd düzeylerinde diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı düşüklük saptandı.

12. haftada tüm gruplarda anlamlı fark bulunamadı.

Saf albumin ile BTxA'yı sulandırmanın, başlangıçta SF veya TFP ile sulandırmaya kıyasla daha kuvvetli paralizi oluşturduğu görüldü ancak SF ile sulandırmanın ilerleyen haftalarda diğer sulandırmalara kıyasla paraliziye daha iyi idame ettirdiği görüldü. TFP içindeki rezidü trombositlerin toksin nötralizasyonunda etkili olabileceği düşünüldü. Albuminin aksonal tomurcuklanma üzerindeki etkilerini araştırarak çalışmalar planlandı.

Plastik cerrahi uygulamalarında toksinin albumin ve/veya TFP ile sulandırılması uygun bulunmadı.

Anahtar kelimeler: Botulinum toksin, Albumin, Trombosit Fakir Plazma

7. SUMMARY

The effect of the platelet poor rabbit plasma supplemented Botulinum A Toxin to biologic efficacy

Platelet poor plasma (PPP) which is obtained with centrifugation of autologous blood, contains high levels of albumin. Botulinum A Toxin (BTxA) is a neurotoxin which cleaves SNAP-25 protein and prevents acetylcholine release to neuromuscular junction.

Aim of this study is to investigate alteration on biological efficacy of BTxA when it is diluted with albumin or PPP.

Anterior auricular muscle (AAM) model was used in twenty-four New Zealand rabbits which were divided into 4 groups. Right AAM was injected in all groups.

In Group I dilution of toxin with normal saline was done and injection was performed in a dose of 2.5 U. In Group II toxin dilution was done with lyophilized rabbit serum albumin and in Group III with each rabbit's own PPP. Group IV was designed as control group and only normal saline was injected.

Photographic documentation and electrophysiological studies were performed in all groups before injection.

Median amplitudes were lower in Group II when compared with other groups at the 2nd week and this difference was statistically significant.

At the 6th week Group I had lower median amplitudes according to other groups and this finding was statistically significant.

At the 12th week there was no statistically significant difference in visual and electrophysiological findings between groups.

Toxin diluted with pure albumin caused stronger paralysis initially when compared with saline and PPP dilution however saline dilution maintained better paralytic effect later on. Residual thrombocytes in PPP could be primary cause of toxin neutralization. Pure albumin could cause axonal sprouting at neuromuscular junction and future researches have been planned on this subject.

BTxA dilution with albumin or PPP was found to be inappropriate for routine daily practice in plastic surgery.

Key Words: Botulinum toxin, Albumin, Platelet Poor Plasma

8. KAYNAKLAR

- 1) Findikcioglu K, Findikcioglu F, Yavuzer R, Elmas C, Atabay K. Effect of trombosit-rich plasma and fibrin glue on healing of critical-size calvarial bone defects.. J Craniofac Surg. 2009; 34-40.
- 2) Altuntaş Z, Gündeşlioğlu A, İnce B, Dadacı M, Savacı N. Trombositten Zengin Plazma, Trombositten Fakir Plazma, Trombositten Zengin Fibrin Kavramları, Yara iyileşmesindeki Biyolojik Roller ve Plastik Cerrahide Kullanım AlanlarıTurk Plast Surg. 2014;22(2) 49-53.
- 3) Spotnitz WD, Burks SG, Prabhu R (2005) Fibrin-based adhesives and hemostatic agents. In:Quinn JV (ed) Tissue adhesives in clinical medicine. BC Decker, Hamilton, Ontario, Canada, pp 77–112.
- 4) Spotnitz WD. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. World J Surg. 2010 Apr;34(4):632-4.
- 5) Efeoglu C, Akc,ay YD, Ertürk S (2004) A modified method for preparing platelet-rich plasma: an experimental study. J Oral Maxillofac Surg 62:1403–1407.
- 6) Landesberg R, Roy M, Glickman RS (2000) Quantification of growth factors levels using a simplified method of platelet rich plasma gel preparation. J Oral Maxillofac Surg 58:297–300.
- 7) Marx RE (2004) Platelet rich plasma: evidence to support its use. J Oral Maxillofac Surg 62:489–496.

- 8) Oyama T, Nishimoto S, Tsugawa T, Shimizu F (2004) Efficacy of platelet rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg* 62:555–558.
- 9) Pacifi L, Casella F, Maggiore C (2002) Plasma arricchito di piastrine: metodi di estrazione e potenzialita' d'uso. *Minerva Stomatol* 51:341–350.
- 10) Montecucco C, Schiavo G, Tugnoli V, de Grandis D. Botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic applications. *Mol Med Today*. 1996 Oct;2(10):418-24.
- 11) Montecucco C, Schiavo G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Molecular Microbiology*. 1994;13(1):1-8.
- 12) Dickerson TJ, Janda KD. The use os small molecules to investigate molecular mechanisms and therapeutic targets os botulinum neurotoxin A intoxication. *ACS Chem Biol*. 2006 Jul 21;1(6):359-69.
- 13) Rollnik JD, Matzke M, Wohlfarth K, Dengler R, Bigalke H. Low-dose treatment of cervical dystonia, blepharospasm and facial hemispasm with albumin-diluted botulinum toxin type A under EMG guidance. An open label study. *Eur Neurol*. 2000;43(1):9-12.
- 14) Bigalke H, Wohlfarth K, Irmer A, Dengler R. Botulinum A toxin : Dysport improvement of biological avaiability. *Exp Neurol*. 2001 Mar;168(1):162-70.
- 15) Bulam H, Ayhan S, Sezgin B, Zinnuroglu M, Konac E, Varol N, et al. The Inhibitory Effect of Platelet-Rich Plasma on Botulinum Toxin Type-A: An Experimental Study in Rabbits. *Aesthetic Plast Surg*. 2015 Feb;39(1):134-40.

- 16) White JG. Platelet-Structure. In: Michelson A.D. Platelets 2nd ed. Elsevier Inc. 2013;45-73.
- 17) Andrews RK, Berndt MC. Platelet physiology and thrombosis. *Throm Res.* 2004;114(5-6):447-53. Review.
- 18) Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J. Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the "secrete" life of thrombocytes. *Blood.* 2000 Nov 15;96(10):3334-42.
- 19) Flaumenhaft R. Platelet Secretion. In: Michelson A.D. Platelets 3rd ed. Elsevier Inc. 2013;343-66.
- 20) Young JZ, Medawar PB (1940) Fibrin suture of peripheral nerves. *Lancet* 275:126–132.
- 21) Cronkite EP, Lozner EL, Deaver J (1944) Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting. *JAMA* 124:976–978.
- 22) Matras H, Dings HP, Manoli B et al (1972) Zur nachtlosen Interfaszikularen Nerventransplantation im Tierexperiment. *Wein Med Wochenschr* 122:517–523.
- 23) Spotnitz WD, Welker R (1999) Clinical uses of fibrin sealant. In: Mintz PD (ed) *Transfusion therapy: clinical principles and practice*, 1st edn. AABB Press, Bethesda, MD, pp 199–222.
- 24) Dresdale A, Rose EA, Jeevanandam V et al (1985) Preparation of fibrin glue from single donor fresh-frozen plasma. *Surgery* 97:750–755.

- 25) Franco D, Franco T, Schettino AM, Filho JM, Vendramin FS Protocol for obtaining platelet-rich plasma (PRP), platelet-poor plasma (PPP), and thrombin for autologous use *Aesthetic Plast Surg*. 2012 Oct;36(5):1254-9.
- 26) Vendramin FS, Franco D, Nogueira CM, Pereira MS, Franco T (2006) Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. *Rev Col Bras Cir* 33:24–28.
- 27) Rasedovich M, Goubran HA, Burnouf T (1997) Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties and current clinical use. *Vox Sang* 72:133–143.
- 28) Man D, Plosker H, Winland-Brown JE (2001) The use of autologous platelet rich plasma (platelet gel) and autologous platelet poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 107:229–237.
- 29) Spotnitz WD, Burks S (2008) Hemostats, sealants, and adhesives: components of the surgical toolbox. *Transfusion* 48:1502–1516.
- 30) Spotnitz WD, Mintz PD, Avery N et al (1987) Fibrin glue from stored human plasma: an inexpensive and efficient method for local blood bank preparation. *Am Surg* 53:460–464.
- 31) Rasedovich M, Goubran HA, Burnouf T (1997) Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties and current clinical use. *Vox Sang* 72:133–143.
- 32) Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R (2001) Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 41:1217–1224.

- 33) Zucchelli P, Silvestri AR. Production and use of fibrin glue at blood transfusion service of Bellaria-Maggiore hospital bologna. *Transfus Apher Sci.* 2004 Apr;30(2):157–161.
- 34) Kazal LA, Amsel S, Miller OP, Tocantins LM. The preparation and some properties of fibrinogen precipitated from human plasma by glycine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1963; 113:989-94.
- 35) Saad Setta H, Elshahat A, Elsherbiny K, Massoud K, Safe I. Platelet-rich plasma versus platelet-poor plasma in the management of chronic diabetic foot ulcers: a comparative study. *Int Wound J.* 2011 Jun;8(3):307-12.
- 36) Bhanot S, Alex JC. Current application of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 2002 Feb;18(1):27–33.
- 37) Kazakos K, Lyras DN, Verettas D, Tilkeridis K, Tryfonidis M. The use of autologous PRP gel as an aid in the management of acute trauma wounds. *Injury* 2009 Aug 40(8):801–5.
- 38) Oz MC, Jeevanandam V, Smith CR, Williams MR, Kaynar AM, Frank RA, et al. Autologous fibrin glue from intraoperatively collected platelet-rich plasma. *Ann Thorac Surg.* 1992 Mar;53(3):530-1.
- 39) Floryan KM, Berghoff WJ. Intraoperative use of autologous platelet-rich and platelet-poor plasma for orthopedic surgery patients. *AORN J.* 2004 Oct;80(4):668-74.

- 40) Tawes RL Jr, Sydorak GR, DuVall TB. Autologous fibrin glue: the last step in operative hemostasis. *Am J Surg.* 1994 Aug;168(2):120-2.
- 41) Saratzis N., Saratzis A., Melas N., Kiskinis D. Non-activated autologous platelet-rich plasma for the prevention of inguinal wound-related complications after endovascular repair of abdominal aortic aneurysms *J Extra Corpor Technol.* 2008 Mar;40(1):52-6.
- 42) Pietrzak WS, An YH, Kang QK, Demos HA, Ehrens KH. Platelet-rich and platelet-poor plasma: development of an animal model to evaluate hemostatic efficacy. *J Craniofac Surg.* 2007 May;18(3):559-67.
- 43) Christenson JT, Kalangos A. Autologous fibrin glue reinforced by platelets in surgery of ascending aorta. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2004 Aug;52(4):225-9.
- 44) Kjaergård HK Patient-derived fibrin sealant: clinical, preclinical and biophysical aspects. *Dan Med Bull.* 2003 Nov;50(4):293-309.
- 45) Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 1997 Nov;55(11):1294-9.
- 46) Mooney E, Loh C, Pu LL: ASPS/PSEF Technology Assessment Committee. The Use of fibrin glue in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2009 Sep;124(3):989-92.
- 47) Schettino AM, Franco D, Franco T, Filho JM, Vendramin FS. Use of autologous fibrin glue (platelet-poor plasma) in abdominal dermolipectomies. *Aesthetic Plast Surg.* 2012 Dec;36(6):1296-301.

- 48) Shukla HD, Sharma SK. Clostridium botulinum: a bug with beauty and weapon. Crit Rev Microbiol. 2005;31(1):11-8.
- 49) Scott AB, Rosenbaum A, Collins CC. Pharmacologic weakening of extraocular muscles. Invest Ophthalmol. 1973 Dec;12(12):924-7.
- 50) Carruthers JD, Carruthers JA. Treatment of glabellar frown lines with C. Botulinum-A exotoxin. J Dermatol Surg Oncol. 1992;18(1):17-21.
- 51) The American Society for Aesthetic Plastic Surgery, National Data Bank Statistics. 2014.
- 52) Huang W, Foster JA, Rogachefsky AS. Pharmacology of botulinum toxin. J Am Acad Dermatol. 2000 Aug;43(2pt 1):249-59.
- 53) Lebeda FJ, Cer RZ, Mudunuri U, Stephens R, Singh BR, Adler M. The zinc-dependent protease activity of the botulinum neurotoxins. Toxins (Basel). 2010 May;2(5):978-97.
- 54) Smith LA. Botulism and vaccines for its prevention. Vaccine. 2009 Nov 5;27 Suppl 4:D33-9.
- 55) Caccin P, Rosetto O, Rigoni M, Johnson E, Schiavo G, Montecucco C. VAMP/synaptobrevin cleavage by tetanus and botulinum neurotoxins is strongly enhanced by acidic liposomes. FEBS Lett. 2003 May 8;542(1-3):132-6.
- 56) Keller JE. Recovery from botulinum neurotoxin poisoning in vivo. Neuroscience, 2006 May 12;139(2):629-37.

- 57) Pelizzari R, Rossetto O, Schiavo G, Montecucco C. Tetanus and botulinum neurotoxins: mechanism of action and therapeutic uses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1999 Feb 28;354(1381):259-68.
- 58) Jankovic J., et al., *Botulinum Toxin Therapeutic Clinical Practice and Science* 1st Edition, Elsevier Saunders, 2009.
- 59) Dickerson JT, Janda KD. The use of Small Molecules to Investigate Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets for Treatment of Botulinum Neurotoxin A Intoxication. *ACS Chem Biol*. 2006; 1(6):359-69.
- 60) Barr, John R. Botulinum Neurotoxin Detection and Differentiation by Mass Spectrometry. *Emerging Infectious Diseases* 2005; 11(10):1578–83.
- 61) Botox prescribing information, March 2010. Available at: http://www.allergan.ca/Assets/pdf/botox_mechanism_of_action.pdf.
- 62) Simpson LL. Ammonium chloride and methylamine hydrochloride antagonize clostridial neurotoxins. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983 Jun;225(3):546-52.
- 63) Santafé MM, Urbano FJ, Lanuza MA, Uchitel OD. Multiple types of calcium channels mediate transmitter release during functional recovery of botulinum toxin type A-poisoned mouse motor nerve terminals. *Neuroscience*. 2000;95(1):227-34.
- 64) Bakry N, Kamata Y, Simpson LL. Lectins from *Triticum vulgaris* and *limax flavus* are universal antagonists of botulinum neurotoxin and tetanus toxin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991 Sep;258(3):830-6.

- 65) Burnett JC, Schmidt JJ, Stafford RG, Panchal RG, Nguyen TL, Hermone AR, et al. Novel small molecule inhibitors of botulinum neurotoxin A metalloprotease activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Oct 10;310(1):84-93.
- 66) Capkova K, Hixon MS, Pellett S, Barbieri JT, Johnson EA, Janda KD. Benzylidene cyclopentenones: First irreversible inhibitors against botulinum neurotoxin A's zinc endopeptidase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010 Jan 1;20(1):206-8.
- 67) Aoki KR, Smith LA, Atassi MZ. Mode of action of botulinum neurotoxins: current vaccination strategies and molecular immune recognition. *Crit Rev Immunol*. 2010;30(2):167-87.
- 68) Dressler D. Clinical presentation and management of antibody-induced failure of botulinum toxin therapy. *Mov Disord*. 2004 Mar;19 Suppl 8:S92-S100.
- 69) Schmidt JJ, Bostian KA. Endoproteinase activity of type A botulinum neurotoxin: substrate requirements and activation by serum albumin. *J Protein Chem*. 1997 Jan;16(1):19-26.
- 70) McAllister LA, Hixon MS, Kennedy JP, Dickerson TJ, Janda KD. Superactivation of botulinum neurotoxin serotype A light chain metalloprotease: a new wrinkle in botulinum neurotoxin. *J Am Chem Soc*. 2006 Apr 5;128(13):4176-7.

- 71) Elmas C, Ayhan S, Tuncer S, Erdogan D, Calguner E, Basterzi Y, et al. Effect of fresh and stored botulinum toxin a on muscle and nerve ultrastructure: an electron microscopic study. *Ann Plast Surg.* 2007 Sep;59(3):316-22.
- 72) Glanzman RL, Gelb DJ, Drury I, Bromberg MB, Truong DD. Brachial plexopathy after botulinum toxin injections. *Neurology.* 1990 Jul;40(7):1143.
- 73) Schnider P, Brichta A, Schmied M, Auff E. Gallbladder dysfunction induced by botulinum A toxin. *Lancet* 1993 Sep 25;342(8874):811-2.
- 74) Latimer PR, Hodgkins PR, Vakalis AN, Butler RE, Evans AR, Zaki GA. Necrotising fasciitis as a complication of botulinum toxin injection. *Eye (Lond).* 1998;12 (Pt 1): 51-3.
- 75)Cartee TV, Monheit GD. An overview of botulinum toxins:past, present and future. *Clin Plast Surg.* 2011 Jul;38(3):409-26.
- 76) Davies JR, Morgan RS, Wright EA, Wright GP. The results of direct injections of botulinum toxin into the central nervous system of rabbits *J Physiol.* 1953 Jun 29;120(4):618-23.
- 77) Wienkers K, Helveston EM, Ellis FD, Cadera W Botulinum toxin injection into rabbit vitreous. *Ophtalmic Surg.* 1984 Apr; 15(4):310-4.

- 78) Jabor MA, Kaushik R, Shayani P, Ruiz-Razura A, Smith BK, Morimoto KW, et al. Efficacy of reconstituted and stored botulinum toxin type A: an electrophysiologic and visual study in the auricular muscle of the rabbit *Plast Reconstr Surg*. 2003 Jun;111(7):2419-26; discussion 2427-31.
- 79) Görgü M, Silistreli OK, Karantinaci B, Ayhan M, Ozdemirkiran T, Celebisoy M. Interaction of botulinum toxin type A with local anesthetic agents: an experimental study with rabbits. *Aesthetic Plast Surg*. 2006 Jan-Feb;30(1):59-64.
- 80) Popesko P, *Colour Atlas of Anatomy of Small Laboratory Animals*. Saunders Ltd. 2003;18-22.
- 81) Mohammadi B, Kollewe K, Wegener M, Bigalke H, Dengler R. Experience with long-term treatment with albumin-supplemented botulinum toxin type A. *J Neural Transm (Vienna)*. 2009 Apr;116(4):437-41.
- 82) Salzwedel J. Preparation of platelet poor plasma. <https://www.marshfieldlabs.org/sites/ltrm/Human/Documents/Preparation%20of%20Platelet%20Poor%20Plasma.pdf> 2013 Sep.
- 83) Burnett JC, Ruthel G, Stegmann CM, Panchal RG, Nguyen TL, Hermone AR, et al. Inhibition of metalloprotease botulinum serotype A from a pseudo-peptide binding mode to a small molecule that is active in primary neurons. *J Biol Chem*. 2007; 282(7):5004-14.
- 84) Goodnough MC, Johnson EA. Stabilization of botulinum toxin type A during lyophilization. *Appl Environ Microbiol*. 1992 Oct;58(10):3426-8.

85) Lange O, Bigalke H, Dengler R, Wegner F, deGroot M, Wohlfarth K. Neutralizing antibodies and secondary therapy failure after treatment with botulinum toxin type A: much ado about nothing? Clin Neuropharmacol. 2009 Jul-Aug;32(4):213-8.

86) Frevert J. Formulation for a protein pharmaceutical without added human serum albumin (hsa) CA 2532475 A1 Merz Pharma GmbH & Co. KGaA. available at: <http://www.google.co.ve/patents/US7829525>.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Serhat

Soyadı: ŞİBAR

Doğum Yeri ve Tarihi: Isparta / 24.04.1985

Eğitim:

Tıpta Uzmanlık: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi 2009-2016

Lisans - Y. Lisans: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi 2003-2009

Ortaöğretim: Isparta Anadolu Lisesi 1996-2003

İlköğretim: Mustafa Şener İlkokulu 1991-1996

Yabancı Dil: İngilizce

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar: -

Bilimsel Etkinlikleri (aldığı burslar, ödüller, projeleri, yayınları):

1. Sezgin B, Findikcioglu K, Kaya B, **Sibar S**, Yavuzer R. Mirror on the wall: a study of women's perception of facial features as they age. Aesthet Surg J. 2012 May 1;32(4):421-5. Epub 2012 Mar 20.

2. Sezgin B, **Sibar S**, Bulam H, Findikcioglu K, Tuncer S, Dogan B. Disulfiram Implantation for the Treatment of Alcoholism: Clinical Experiences from the

Plastic Surgeon's Point of View Arch Plast Surg. 2014 Sep;41(5):571-5. doi: 10.5999/aps.2014.41.5.571. Epub 2014 Sep 15.

3. Bulam H, Ayhan S, Yilmaz G, Sezgin B, **Sibar S**, Tuncer S, Findikcioglu K, Latifoglu O. The Effect of Subcutaneous Platelet-Rich Plasma Injection on Viability of Auricular Cartilage Grafts J Craniofac Surg. 2015 Jul;26(5):1495-9.